Aus der Rheinischen Landesklinik in Köln-Merheim
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Bergener

Bestimmung therapeutischer Konzentrationen von Clobazam und Norclobazam im Serum

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Karl Adenauer

Düsseldorf 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0036

Aus der Rheinischen Landesklinik in Köln-Merheim
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Bergener

Bestimmung therapeutischer Konzentrationen von Clobazam und Norclobazam im Serum

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karl Adenauer

Düsseldorf 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
gez. : Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez. Prof. Dr. Bergener
Korreferent
gez. Prof. Dr. Heinrich

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Theoretischer Teil	3
2.1.	Grundlagen der Pharmakokinetik der 1,4-Benzodiazepine	4
2.2.	Übersicht über die Klasse der Benzodiazepine, ihren Metabolismus, ihre Wirkungsweise und ihre Anwendungsbereiche	13
2.2.1.	Zur Geschichte der Benzodiazepine	13
2.2.2.	Synthese	15
2.2.3.	Struktur-Aktivitätsbeziehungen	16
2.2.4.	Metabolismus der 1,4-Benzodiazepine	19
2.2.5.	Der Einfluß anderer Stoffe auf den Metabolismus, die Wirkung und die Pharmakokinetik der 1,4-Benzodiazepine	26
2.2.6.	Wirkungsweise der Benzodiazepine - Neurophysiologie und Neuropharmakologie	28
2.2.7.	Anwendungsbereiche der Benzodiazepine	33
2.2.7.1.	Emotionelle Störungen	33
2.2.7.2.	Neurologie	35
2.2.7.3.	Innere Medizin	37
2.2.7.4.	Gynäkologie und Geburtshilfe	38
2.2.7.5.	Anästhesie und Chirurgie	39
2.2.7.6.	Alkoholismus und andere Abhängigkeitszustände	41
2.2.7.7.	Schlaf	43
2.3.	Nebenwirkungen und Kontraindikationen	45
2.4.	Erfahrungen mit Clobazam	48

Seite

3. Experimenteller Teil 53

3.1. Nachweisverfahren für Benzodiazepine - Hinweise zur Literatur - 53

3.2. Material, Methoden und Resultate 55

3.2.1. Meßgeräte 55

3.2.2. Benzodiazepine bzw. deren Metabolite 56

3.2.3. Chemikalien 56

3.2.4. Lösungsmittel und Fließmittel 56

3.2.5. Vorläufige Messungen 56

3.2.5.1. In der Gaschromatographie 56

3.2.5.2. In der Hochdruckflüssigkeitschromatographie 57

3.2.6. Vorläufige Ergebnisse 59

3.2.6.1. In der Gaschromatographie 59

3.2.6.2. In der Hochdruckflüssigkeitschromatographie 60

3.2.7. Extraktionen aus der wässrigen Phase 65

3.2.8. Optimierung des Trennsystems - Definitive Ergebnisse der flüssigkeitschromatographischen Messungen ("in vitro-Messungen") - Erstellen der Eichkurven - 67

3.2.9. Extraktionen aus Human-Seren 74

3.2.10. Ergebnisse der flüssigkeitschromatographischen Analysen aus Human-Seren ("in vivo-Messungen") 76

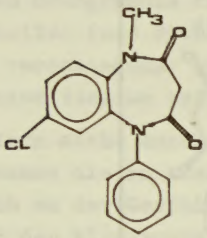
4. Diskussion 81

5. Zusammenfassung und Schluß 84

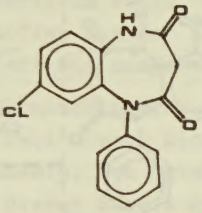
Literaturverzeichnis 86

1. Einleitung und Problemstellung

CLOBAZAM (1) ist ein neues 1,5-Benzodiazepinderivat, dessen erster Metabolit, NORCLOBAZAM (2), ebenfalls als Tranquilizer wirksam ist.



1



2

systematischer Name:

7-Chlor-1-methyl-5-phenyl-
1H-1,5-benzodiazepin-2,4
(3H,5H)-dion

Abbildung 1 zeigt den Metabolismus von Clobazam bei Ratte, Hund, Affe und Mensch.

Vor der allgemeinen Anwendung eines neuen Arzneimittels ist es u.a. notwendig, Daten über den Verlauf des Serumspiegels bei ein- und mehrfacher Dosierung, besonders auch über eine eventuelle Akkumulierung des Pharmakons und eventuell wirksamer oder toxischer Metaboliten zu gewinnen.

Für solche Studien war es notwendig, eine einfache, empfindliche und spezifische Analysenmethode zu entwickeln, die nach Möglichkeit den Nachweis und die quantitative Erfassung beider Stoffe nebeneinander gestattet.

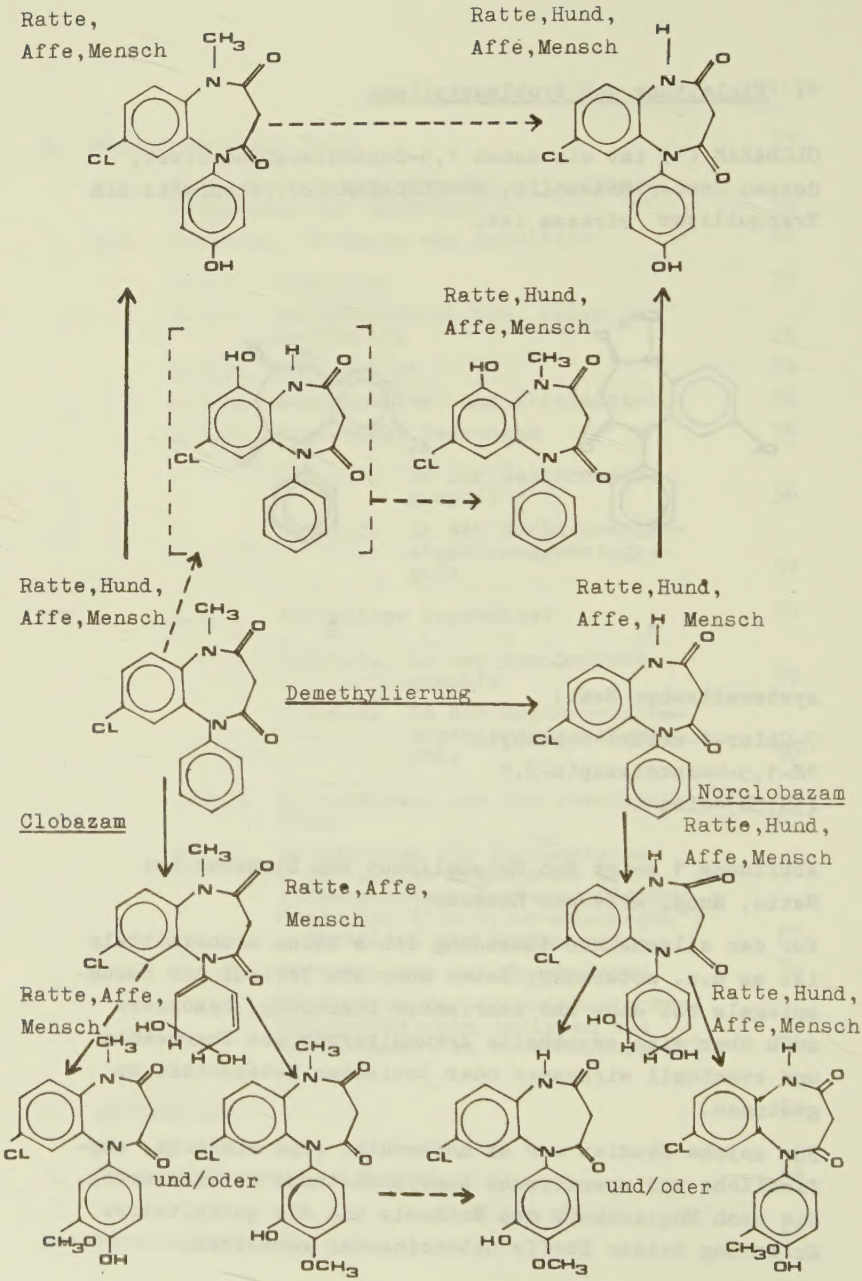


Abb.1: Metabolismus von Clobazam bei Ratte, Hund, Affe u. Mensch
Aus: Wissenschaftl. Prospekt der Fa. Hoechst, Okt. 1977

2. Theoretischer Teil

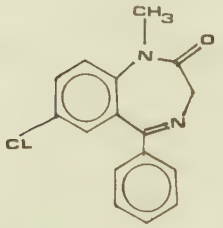
Die im folgenden gebrachten Daten zur Pharmakokinetik der Benzodiazepine stützen sich unter anderem auf Ausführungen in dem Buch "Benzodiazepines in Clinical Practice" von Greenblatt und Shader[1)]. In dieser neuesten Monographie über Benzodiazepine wurden ca. 2.000 Arbeiten (aus Büchern, Zeitschriften etc.), die sich in verschiedener Weise mit Stoffen aus der Klasse der Benzodiazepine befassen, zitiert und ausgewertet.

Sofern nicht durch andere Literaturhinweise angegeben, stammen die im theoretischen Teil dieser Dissertation auch zu der Geschichte, der Chemie, dem Metabolismus und der klinischen Anwendung dieser Stoffe gemachten Angaben bzw. zitierten Arbeiten aus dieser Monographie.

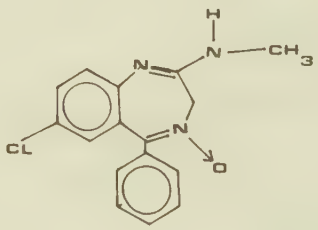
2.1. Grundlagen der Pharmakokinetik

Im Gegensatz zu dem von der Firma Hoechst synthetisierten Clobazam (Frisium^{R}) handelt es sich bei den in den folgenden Abschnitten gemachten Angaben ausschließlich um Vertreter der bisher in der medizinischen Anwendung üblichen 1,4-Benzodiazepine, also Stoffe mit Stickstoffatomen in Position 1 und 4 des Benzodiazepinmoleküls.

Als Beispiel diene zunächst Diazepam (Valium^{R}), das einer der ersten Vertreter aus der Benzodiazepin-Reihe war. Diazepam (3), das im Gegensatz zu Chlordiazepoxid (Librium^{R}) (4) auch parenteral verabreicht werden kann, ist fettlöslich und relativ wasserunlöslich und im Serum über einen weiten Konzentrationsbereich stark an Albumin gebunden (95 %). Es wird nach oraler Einnahme schnell resorbiert. Nach einer einzigen oralen Dosis von 10 - 15 mg erhält man innerhalb von 2 Stunden Serumspiegel von 200 bis 300 ng/ml. Zwischen einzelnen Individuen gibt es große Schwankungen.



3



4

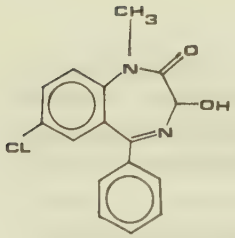
Bei diesen Konzentrationen (200 - 300 ng/ml) werden fast immer subjektiv Zeichen von Schläfrigkeit angegeben. Die Blutspiegel fallen anschließend, zunächst schnell, dann langsam. Der erste schnelle Abfall resultiert aus dem Übergang des Pharmakons vom Intravasal- in den Extravasalraum, also einer Verteilung auf die Gewebe. Diese Phase ist durch eine nur wenige Stunden

dauernde Halbwertzeit gekennzeichnet. Der zweite langsame Abfall des Blutspiegels repräsentiert die (langsame) Biotransformation und Elimination mit einer Halbwertzeit, die bei den einzelnen Individuen stark variiert und von 20 - 50 Std. reicht.

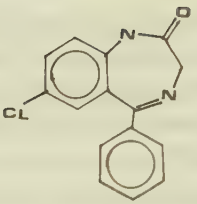
Dieses biphasische Eliminationsmuster zeigt sich vor allem nach intravenöser Verabreichung von Diazepam. Eine Dosis von 10 - 20 mg erzeugt hierbei nach 4 Minuten einen Blutspiegel von ungefähr 1 µg/ml, der klinisch mit einer starken Sedierung und einer kurzen Periode von anterograder Amnesie einhergeht. Die Konzentrationen fallen dann innerhalb einer Stunde rapide bis auf Werte von ungefähr 250 ng/ml ab, was sich klinisch durch eine "Wiedererholung" der Probanden bemerkbar macht. Die Eliminationsrate verlangsamt sich dann. Baird und Hailey bemerkten ca. 6 Std. nach einer i.v.-Injektion von Diazepam einen Wiederanstieg der Blutspiegel, was mit erneutem Auftreten von Schläfrigkeit korrelierte. Dieses Verhalten kann sowohl auf eine Mobilisation von Diazepam aus Lipidspeichern als auch auf eine Freigabe von Diazepam oder seiner Metaboliten aus dem enterohepatischen Kreislauf zurückgeführt werden.

Wiederholte orale Verabreichung von Diazepam führt beim Menschen zur Akkumulation. Wenn das Mittel täglich in unterteilten Dosen eingenommen wird, steigen die Blutspiegel allmählich an, bis nach 5 bis 7 Tagen ein Plateau erreicht wird. Nun bewegen sich die Konzentrationen in einem Bereich zwischen 100 und 400 ng/ml, abhängend von Größe und Frequenz der Dosen. Dieses Verhalten tritt bei allen Pharmaka mit langen Halbwertzeiten gegenüber den Einnahmeintervallen auf.

Pharmakologisch aktive Metaboliten wie Temazepam (5) und Desmethyldiazepam (Nordiazepam) (6) können im Blut bereits nach einer einzigen Dosis gefunden werden.



5



6

Nach mehreren Tagen der Therapie mit Diazepam beginnen die Blutspiegel von Nordiazepam, dem Hauptmetaboliten beim Menschen, zu akkumulieren. Beim steady state liegen die Werte bei denen der Muttersubstanz oder können diese sogar überschreiten. Nach Beendigung der Therapie fallen beide Blutspiegel (allmählich) ab, allerdings ist Nordiazepam mit einer Halbwertzeit von bis zu 96 Std. länger im Plasma aufzufinden als Diazepam. Die genannten Verhältnisse werden in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

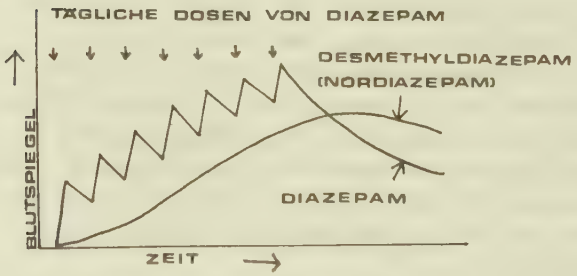
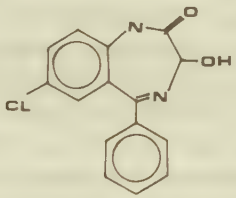


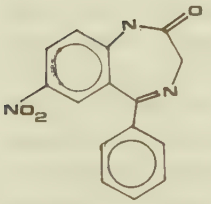
Abb. 2: Blutspiegel von Diazepam und Nordiazepam während und nach wiederholter täglicher Gabe von Diazepam.
Aus: D.J. Greenblatt und R.I. Shader, Benzodiazepines in Clinical Practice [1]

Studien mit radioaktiv markiertem Diazepam haben gezeigt, daß 65 bis 75 % einer oralen Dosis im Urin und 9 bis 10 % mit den Faeces ausgeschieden werden. Die meisten der Ausscheidungsprodukte im Urin sind konjugierte Metaboliten - vor allem Glukuronide und, in einem geringeren Ausmaß Sulfate. Die Konjugate des Oxazepam (7), das sowohl aus Nordiazepam wie auch aus Temazepam entstehen kann, sind stärker vertreten als das konjugierte Nordiazepam. (Eine Übersicht über den Metabolismus der Benzodiazepine wird im 2. Abschnitt des theoretischen Teils aufgestellt werden.)

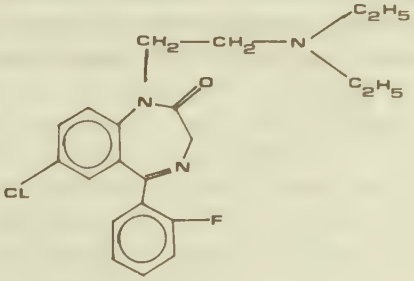


7

Eine Arbeit von Breimer[2] beschäftigt sich unter anderem mit der Pharmakokinetik von Nitrazepam (8) und Flurazepam (9), zweier Benzodiazepinderivate, die sich heute als (schlafinduzierende) Schlafmittel größter Beliebtheit erfreuen, zum einen wegen ihres größeren Sicherheitsbereiches (als andere Schlafmittel) und zum anderen wegen fehlender ernster Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka.



8



9

Rieder[3] studierte die Pharmakokinetik von Nitrazepam bei 6 gesunden Erwachsenen nach einer einzigen intravenösen und oralen Dosis von 10 mg. Die durchschnittliche Eliminations-Halbwertzeit betrug nach intravenöser Verabreichung 21 Std. (Variationsbreite: 18 - 24 Std.), nach Einnahme per os 25 Std. (Variationsbreite: 21 - 28 Std.) Das Ausmaß der Bioverfügbarkeit (oral verglichen mit i.v.) variierte von 53 bis 94 %, mit einem Durchschnittswert von 78 %. Die Konzentrationen nach oraler Einnahme beliefen sich nach 2 Std. (Maximum) auf Werte zwischen 68 und 108 ng/ml. Breimer et al.[4] entwickelten eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von unverändertem Nitrazepam im Plasma und benutzten sie zur Untersuchung der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Nitrazepam nach oraler Verabreichung verschiedener Dosierungsformen. Die Plasmaproben wurden in regelmäßigen Abständen in der Zeit zwischen 15 Min. bis 80 Std. nach Verabreichung des Pharmakons gesammelt. Vorläufige Resultate ergaben bei der Zubereitung Mogadon (Mogadan^{R}) bei 7 fastenden gesunden Versuchspersonen ganz unterschiedliche Resorptionsraten mit Spitzenwerten, die zwischen 1/2 und 5 Std. lagen.

Auf die Resorptionsphase folgte eine 2 - 3stündige Verteilungsphase, während der die Plasmaspiegel um das zweifache abnahmen. Im Anschluß an diese Periode erfolgte wiederum ein leichter Anstieg (möglicherweise durch Freisetzung aus dem enterohepatischen Kreislauf), der dann in eine terminale Eliminationsphase erster Ordnung überging (sogenannte ß-Phase). Die durchschnittliche Halbwertzeit belief sich auf 27 Std., sie variierte bei den einzelnen Testpersonen zwischen 18 und 34 Std. Abbildung 3 veranschaulicht die Ergebnisse:

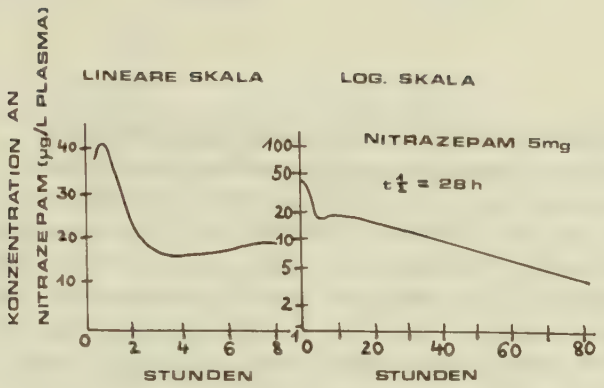


Abb. 3: Plasma-Konzentrationen von Nitrazepam nach einer oralen Dosis von 5 mg.
Aus: D.D. Breimer: Clinical Pharmacokinetics of Hypnotics [2]

Abbildung 4 illustriert die Verhältnisse, wenn Nitrazepam täglich eingenommen wird. Man sieht, daß die Halbwertzeit des Schlafmittels im Vergleich zur gewünschten relativ kurzen Wirkungsdauer während der Nacht ziemlich lang ist und daß das Mittel bei allabendlicher Einnahme akkumuliert. Verschiedene Publikationen zeigen, daß Nitrazepam am folgenden Tage sich noch negativ auf die Leistungsfähigkeit auswirkt.[5, 6, 7]. Dies steht mit der beobachteten langen Verweildauer des Pharmakons im Körper in Übereinstimmung.

Kaplan et al.[8] studierten die Kinetik von Flurazepam und dessen Metaboliten (dem Hydroxyäthyl-Derivat und dem N-1-desalkyl-Derivat) während einer Dosierung von 30 mg täglich. Es wurden nur Spuren der unveränderten Substanz gemessen, während der Hydroxyäthyl-Metabolit über einige Stunden hinweg nachweisbar war. Eine Akkumulierung dieses Metabiliten wurde nicht beobachtet. Der Hauptmetabolit, das N-1-Desalkylderivat, hatte hingegen eine Halbwertzeit, die zwischen 47 und 100 Std. rangierte. Die Spitzenkonzentrationen lagen nach einer einmaligen Dosis bei 10 - 22 ng/ml Blut und stiegen

nach zweiwöchiger Behandlung bis auf Werte von 49 - 142 ng/ml an. Daher kommt es bei ständiger Anwendung von Flurazepam zu einer Anhäufung dieses Metaboliten, von dem sich in Tierstudien gezeigt hat, daß er psychopharmakologisch ähnliche Aktivitäten wie die Muttersubstanz besitzt[9]. Die Tatsache, daß Flurazepam auch nach einmaliger Einnahme eine längere Wirkungsdauer besitzt als es von einem idealen Schlafmittel gefordert wird, wurde auch von anderen Autoren bestätigt.[7, 10, 11]

Abbildung 5 zeigt die oben genannten Verhältnisse.

Zusammenfassend und hervorhebend läßt sich sagen, daß die Benzodiazepine, und vor allem ihre aktiven Metaboliten, die Tendenz zeigen, bei längerem Gebrauch zu akkumulieren. Diese Eigenart muß bei der ärztlichen Verschreibung dieser Stoffe berücksichtigt werden.

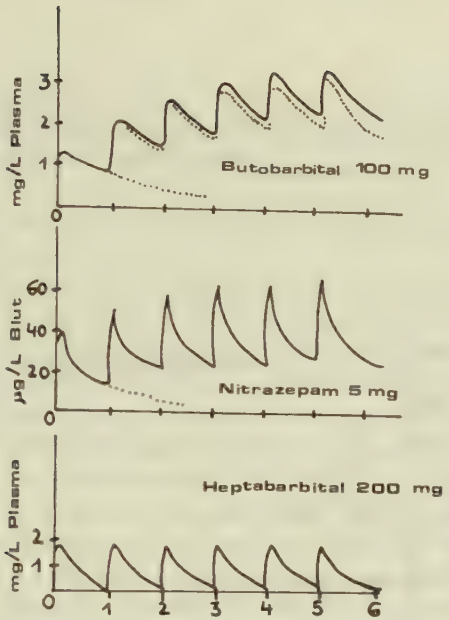


Abb. 4: Plasmaspiegelprofil dreier Schlafmittel während allnächtlicher Gabe.
Aus: D.D. Breimer; Clinical Pharmacokinetics of Hypnotics[2)]

Die Berechnung der Kurven basiert auf Konzentrationen, die im Experiment nach einer einzigen oralen Dosis erhalten wurden und unter Berücksichtigung einer Eliminationshalbwertzeit von 6 Std. für Heptabarbital, 24 Std. für Nitrazepam und 40 Std. für Butobarbital. Im Falle von Nitrazepam zeigt die Kurve einen biphasischen Abfall und bei Butobarbital wird gezeigt, daß die Eliminationsrate nach längerem Gebrauch beschleunigt wird, was einer Enzyminduktion zu verdanken ist (punktierte Linie). Die Abbildung zeigt, daß (vom pharmakokinetischen Standpunkt aus gesehen) eine ideale intermittierende Therapie nur mit einem Mittel erreicht werden kann, das schnell ausgeschieden wird (Heptabarbital), während Medikamente mit langsamer Ausscheidungsrate sich anhäufen.

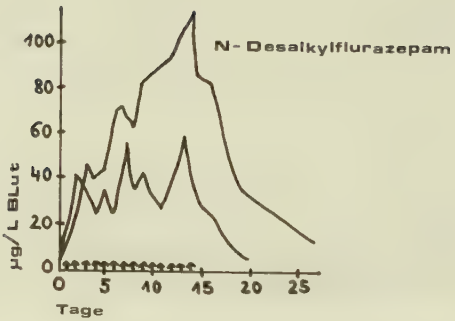


Abb. 5: Blutspiegelprofile von N-Desalkylflurazepam bei zwei gesunden Personen während und nach wiederholter allnächtlicher Gabe von 30 mg Flurazepamhydrochlorid. Die Pfeile zeigen die Zeit der Arzneimitteleinnahme an.
Aus: D.D. Breimer: Clininal Pharmacokinetics of Hypnotics [2]

2.2. Übersicht über die Klasse der Benzodiazepine, ihren Metabolismus, ihre Wirkungsweise und ihre Anwendungsbereiche

2.2.1. Zur Geschichte der Benzodiazepine

Die Synthese von Chlordiazepoxid, dem ersten Benzodiazepin-Tranquilizer war eher zufällig. Leo H. Sternbach, der Mitte der dreißiger Jahre in Krakau/Polen an Benzophenon-Strukturen arbeitete, hatte mehrere Verbindungen, die als Heptoxdiazine bezeichnet wurden, synthetisiert. Erst 1954, als er in den Laboratorien von Roche nach psychopharmakologisch aktiven Substanzen forschte, beschäftigte er sich wieder mit diesen Verbindungen. Er stellte fest, daß die Bezeichnung "Heptoxdiazine" falsch war, denn es handelte sich hierbei nicht um Siebener-Ring-Verbindungen, sondern um Stoffe mit einem Sechser-Ring, die als Chinazolin-3-oxide bekannt waren. Von ungefähr 40 Derivaten, die er einem pharmakologischen Screening unterzog, waren alle inaktiv. Im Jahre 1955 behandelte Sternbach eines dieser Chinazoline mit Methylamin, einem primären Amin. Die neue Verbindung mit der Bezeichnung Ro 5-0690 wurde zunächst wie die anderen 40 Derivate, die mit sekundären und tertiären Aminen behandelt worden waren, für psychopharmakologisch inaktiv gehalten und nicht mehr beachtet. Im Mai 1957 schließlich fand Lowell O. Randall (ebenfalls bei Roche) heraus, daß Ro 5-0690 ganz unerwartete "hypnotische, sedierende und Antistrychnin-Eigenschaften bei Mäusen habe, ähnlich wie Meprobamat. Bei Katzen sei sie beim Hervorrufen von Muskelrelaxation und bei der Blockade des Flexor-Reflexes zwei- bzw. zehnmal so wirksam".

Eine chemische Analyse 1958 ergab, daß die Methylamin-Behandlung des Chinazolin-3-oxides nicht die erwartete Verbindung erbracht hatte, sondern vielmehr eine Verbindung mit einem heterozyklischen Siebener-Ring, ein substituiertes 1,4-Benzodiazepin. In diesem Falle handelte es sich um das 2-methylamino-7-Chlor-5-phenyl-3H-1,4-Benzodiazepin-4-oxid. Es handelte sich also nicht um eine Chinazolin-3-oxid-Verbindung wie bei den 40 anderen inaktiven Vorgängern.

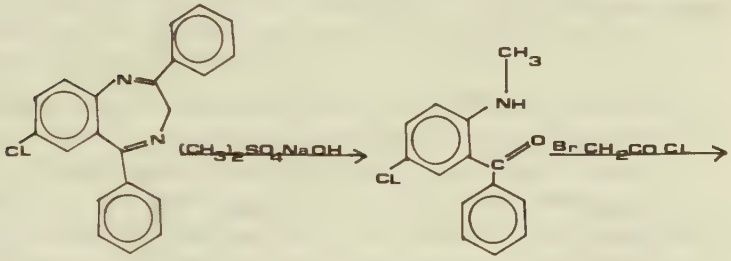
Das neue Pharmakon erhielt die Trivialbezeichnung Methylaminodiazepoxid, die später in Chlordiazepoxid umgeändert wurde. Nach umfangreichen klinischen Studien wurde Chlordiazepoxid 1960 unter dem Handelsnamen Librium^{R} allgemein zugelassen.

Ein weiterer Schritt in der Entwicklung der Benzodiazepine war die Synthese des Diazepammoleküls (1959 durch Sternbach), das unter dem Namen Valium^{R} 1963 in den Handel eingeführt wurde und sich in manchen Wirkeigenschaften als 5 bis 10mal so stark wie Librium herausstellte.

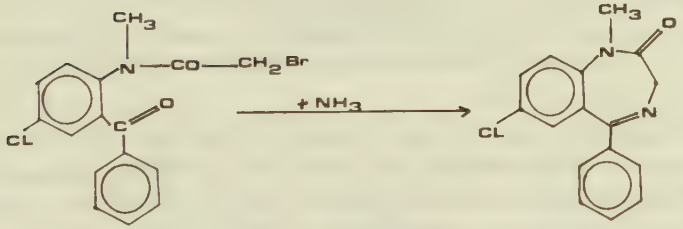
In den folgenden Jahren wurde eine ganze Reihe anderer Benzodiazepin-Derivate hergestellt, auf die noch an anderer Stelle eingegangen wird.

2.2.2. Synthese

Vorstufen der Synthese von Benzodiazepinen sind Benzophenonderivate, die ihrerseits aus Chinazolinen hergestellt werden. Man kann das am Beispiel des Diazepam folgendermaßen formulieren:



Chinazolin-Derivat Benzophenon-Derivat



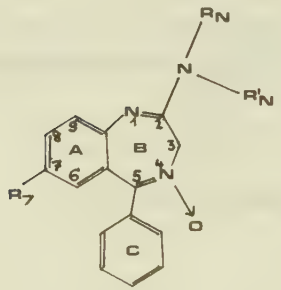
Diazepam

Abb. 6: Synthese eines 1,4-Benzodiazepin-Derivates (Diazepam)
Aus: H. Auterhoff, Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1976, S. 349.

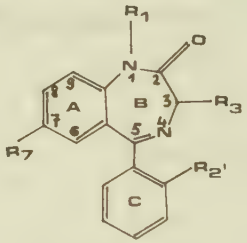
2.2.3. Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Durch intensives pharmakologisches Screening von Hunderten von 1,4-Benzodiazepinen ist man heute in der Lage, über das Verhältnis von chemischer Struktur zu pharmakologischer Aktivität bei Tieren Aussagen zu machen.

Die 1,4-Benzodiazepine fallen in zwei Subkategorien: die 2-Amino-4-Oxide und die 1,3-Dihydro-2-Ketone (Abbildung 7):



2-Amino-4-Oxide



1,3-Dihydro-2-Ketone

Abb. 7: Strukturelle Grundgerüste pharmakologisch aktiver 1,4-Benzodiazepine.
Aus: D.J. Greenblatt und R.I. Shader, Benzodiazepines in Clinical Practive[1)]

Chlordiazepoxid gehört zur ersten Gruppe und ist hier eine der pharmakologisch aktivsten Verbindungen. Die 2-Methylamino-Substitution scheint optimal zu sein (R_N = CH_3, R'_N = H): ohne Substitution (R_N = R'_N = H) oder mit größeren Alkylgruppen ist die Aktivität reduziert. Irgendeine Substitution in Position 3 erniedrigt ebenfalls die Wirksamkeit. Eine elektronegative Gruppe in Position 7 ist für die psychopharmakologische Aktivität wesentlich: die Substitution mit Chlor führt zu den wirkungsvollsten Verbindungen, 7-Trifluoromethyl-Substitution läßt die antikonvulsiven Eigenschaften anwachsen. 7-Brom- und 7-Nitro-Verbindungen sind zwar pharma-

kologisch aktiv, aber in einem geringeren Ausmaß als die 7-Chlor-Verbindung. Der Ersatz in R_7 durch Wasserstoff oder eine Methyl-Gruppe reduziert die Aktivität in auffallender Weise. Die Phenyl-Substitution in Position 5 ist für eine optimale Wirksamkeit wesentlich; alle anderen Substituenten verringern die Wirksamkeit.

Beinahe alle anderen klinisch gebräuchlichen 1,4-Benzodiazepine fallen unter die 1,3-Dihydro-2-Keton-Gruppe. Sie haben im allgemeinen eine höhere Gesamtwirkungsstärke pro Milligramm (potency per milligram) als die Chlordiazepoxid-Analogen.

Wiederum ist Elektronegativität in Position 7 notwendig, wobei größerer Elektronen-"Zug" die Wirkungsstärke erhöht. Eine Substitution mit 7-Trifluoromethyl erzeugt höchste Wirksamkeit. 7-Nitro-, -Bromo-, -Chloro- und -Fluoro-Analoge haben eine in der angegebenen Reihenfolge abnehmende Wirksamkeit. 7-Cyano- und 7-Nitro-Substitutionen sind ungefähr gleich, andere Analoge (R_7 = H, CH_3, SCH_3 oder $SOCH_3$) sind weit weniger aktiv.

Phenyl-Gruppen, die an sich stark elektronegativ sind, scheinen die Aktivität herabzusetzen, wenn sie an Position 7 angelagert sind, ebenso wie andere Substituenten mit einer größeren Molekülgröße. Substitutionen an den übrigen Positionen des Ringes A (6, 8 und 9) haben alle die gleiche Wirkung: sie reduzieren die Aktivität.

Die 5-Phenyl-Gruppe an Ring B erzeugt eine optimale Aktivität. 5-Pyridyl-Derivate sind weniger aktiv, und die Wirksamkeit wird durch jede andere Substitution in Position 5 deutlich herabgesetzt. 2'-Halogenierung erhöht die Gesamtwirkung; große 2'-Substitutionen interferieren, ganz gleich ob elektronegativ oder elektropositiv, mit der Aktivität ebenso wie irgendwelche Substituenten an einer anderen als der Ortho-Position im 5-Phenyl-Ring.

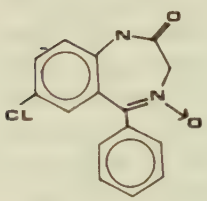
Die Reduktion der 4,5-Doppelbindung beeinflußt ebenfalls die Pharmakodynamik negativ. Die Substitution an N-1 ist von Nutzen, wobei eine 1-Methyl-Gruppe optimal zu sein scheint. 1-Äthyl-, 1-Allyl- ($-CH_2-CH = CH_2$), 1-Acetonyl-

($-CH_2COCH_3$) und 1-Cyclopropyl-Analoge sind weniger aktiv. Längere Substituenten erniedrigen die Wirksamkeit beträchtlich. Die 1-Acetamido-Verbindung ($R_1 = CH_2-CO-NH_2$) hat geringere muskelrelaxierende und zähmende Eigenschaften, aber die antikonvulsiven Eigenschaften bei Tieren scheinen denen des Diazepam äquivalent zu sein. In Stellung 3 scheint die Substitution mit einer Methylgruppe oder überhaupt keine Substitution optimal zu sein. Elektronegative Gruppen (Hydroxy- oder Methoxy-) reduzieren die Wirksamkeit etwas, aber sie setzen wohl auch die Toxizität herab, was möglicherweise der leichteren Konjugierbarkeit zu verdanken ist. Größere Gruppen reduzieren die Aktivität beträchtlich. 2-Thio-Analoge sind verglichen mit den 2-Keto-Verbindungen von geringerer Wirksamkeit. Ersatz der 2-Keto-Funktion durch Wasserstoffatome reduziert ebenfalls die pharmakologische Aktivität, allerdings in einem geringeren Ausmaß.

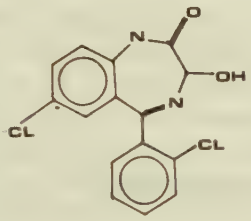
Es muß an dieser Stelle jedoch gesagt werden, daß es sehr schwierig ist, von den oben beschriebenen Erkenntnissen Vorhersagen über das Verhalten der einzelnen Verbindungen beim Menschen zu treffen.

2.2.4. Metabolismus der 1,4-Benzodiazepine

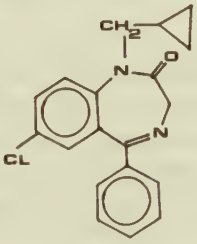
Bevor im folgenden näher auf den Metabolismus der 1,4-Benzodiazepine eingegangen wird, sollen an dieser Stelle noch einige weitere wichtige Vertreter aus dieser Stoffklasse mit ihren Strukturformeln vorgestellt werden.



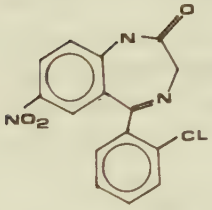
Demoxepam



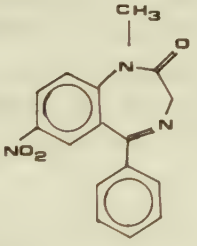
Lorazepam
(Tavor^{R})



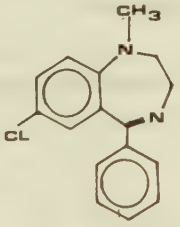
Prazepam
(Demetrin^{R})



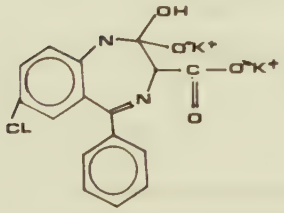
Clonazepam
(Rivotril^{R})



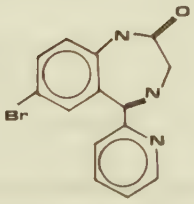
Nimetazepam



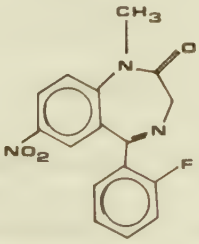
Medazepam
(Nobrium^{R})



Dikalium-
chlorazepat
(Tranxilium^{R})



Bromazepam
(Lexotanil^{R})



Flunitrazepam
(Rohypnol^{R})

Abb. 8: Weitere Vertreter aus der 1,4-Benzodiazepin-Reihe

Es soll angefügt werden, daß die erwähnten Substanzen Oxazepam, Nitrazepam und Flurazepam unter den Namen Adumbran^{R}, Mogadan^{R} und Dalmadorm^{R} im Handel erscheinen.

Eine Übersicht über die möglichen Stoffwechselwege des Diazepam soll die folgende Abbildung geben:

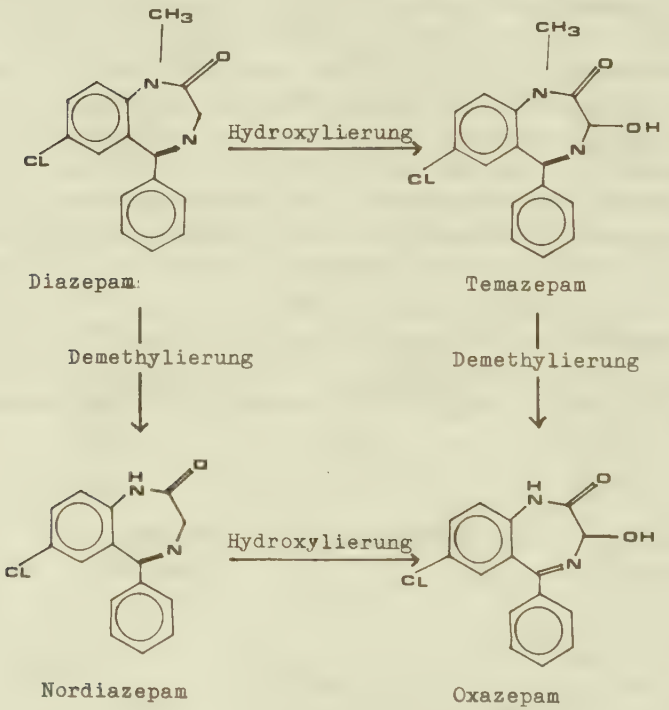


Abb. 9: Metabolismus des Diazepam

Alle drei Metaboliten sind pharmakologisch wirksam. Sie wurden bereits im Zusammenhang mit der Pharmakokinetik des Diazepam (Abschnitt 2.1.) beschrieben. Ergänzend sollte hier gesagt werden, daß Oxazepam (Adumbran^{R})

selbst sich durch eine relativ kurze Halbwertzeit auszeichnet. Sie rangiert bei den verschiedenen Individuen zwischen 3 und 21 Stunden; in einer Studie betrug die mittlere Halbwertzeit (Serum) 4 Std., in einer anderen 15 Std. Oxazepamglukuronid, der Hauptmetabolit, erscheint schnell im Plasma. Oxazepam wird zum größten Teil im Urin ausgeschieden.

Wiederholte Verabreichung von Oxazepam führt im Gegensatz zu Diazepam beim Menschen kaum zur Akkumulierung. Eine Folgerung aus dieser Tatsache ist, daß Diazepam in über die Zeit abnehmenden Dosen gegeben werden könnte, während die Behandlung mit Oxazepam eine stetig gleichbleibende Dosierung erfordern würde. Eine zweite Folgerung ist, daß Oxazepam für die parenterale Antikonvulsivtherapie geeigneter wäre, insofern als eine Sedierung durch Kumulation infolge wiederholter Dosierungen nicht vorkäme. Zur Zeit gibt es allerdings kein Oxazepam-Präparat zur parenteralen Applikation.

Schwartz und Mitarbeiter haben in mehreren Studien den komplexen Metabolismus des Chlordiazepoxides aufgeklärt. Abbildung 10 zeigt den Abbau bis zur Stufe des geöffneten Lactams:

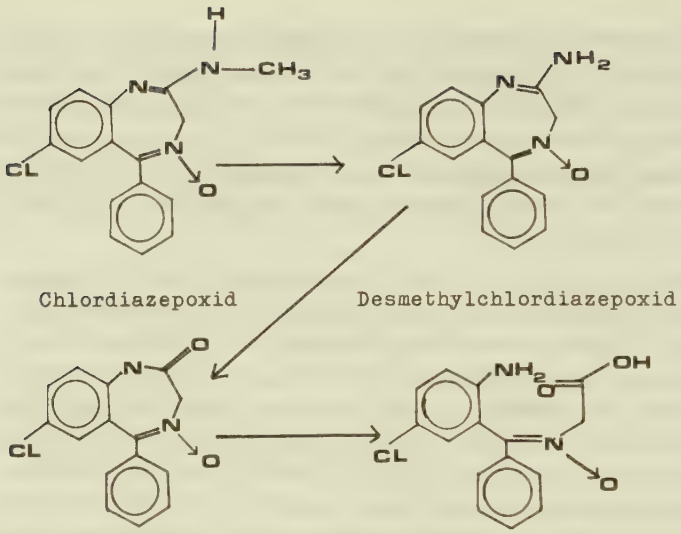


Abb. 10: Metabolismus des Chlordiazepoxides

Randall und Mitarbeiter konnten zeigen, daß auch das Lactam (Demoxepam) noch pharmakologische Wirkungen zeigt[12]. Wird Demoxepam alleine verabreicht (z.B. 20 mg oral), so können eine gewisse Zeit später eine ganze Reihe weiterer Metaboliten im Serum identifiziert werden. Abbildung 11 veranschaulicht die Verhältnisse:

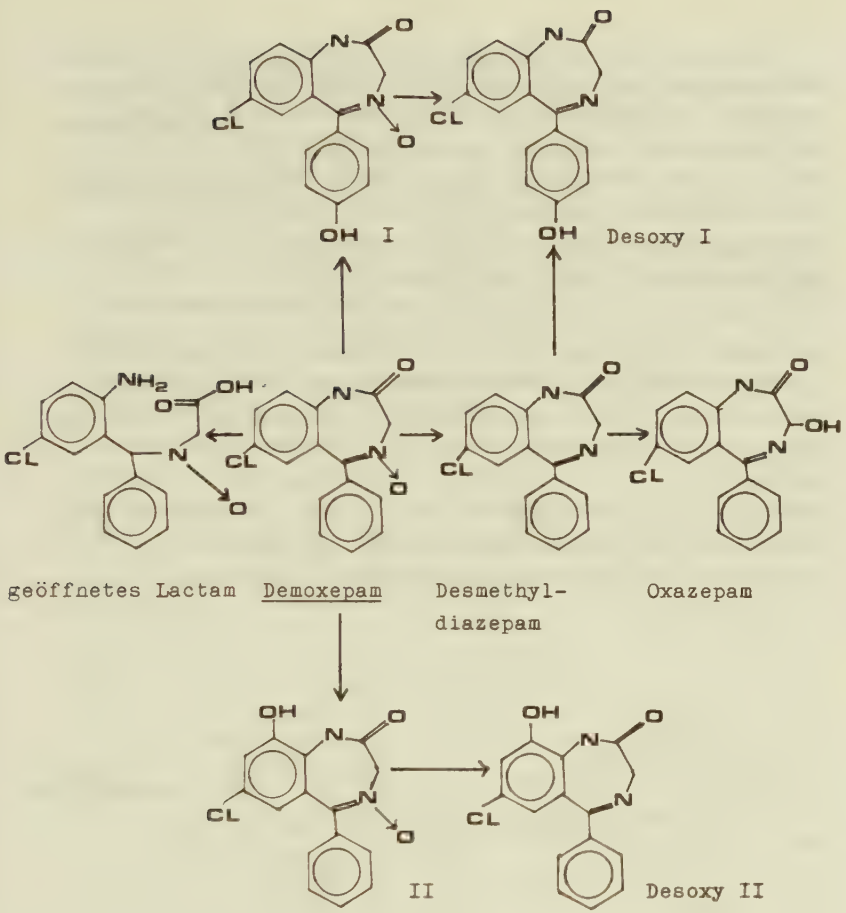


Abb. 11: Metabolismus des Demoxepam
Aus: L.O. Randall et al.: Pharmacology of the metabolites of chlordiazepoxide and diazepam [12])

Wie man sieht, erscheint auch hier das uns bereits bekannte Oxazepam. Demoxepam hat eine Halbwertzeit zwischen 14 bis 95 Std. Nach 7 Tagen sind 60 - 64 % der ganzen

Dosis mit dem Urin und 12 - 18 % mit den Faeces ausgeschieden. Freies Demoxepam macht ungefähr 25 % der totalen Urinausscheidung aus und das geöffnete Lactam weitere 3 - 5 %. Ungefähr 15 % der Metaboliten im Urin sind an Glukuronsäure gekoppelt. Es handelt sich hierbei in erster Linie um Oxazepam und in einem geringeren Ausmaß um 5-Parahydroxyphenyl- und 9-Hydroxyderivate, die in Abbildung 11 als Verbindungen I und II bezeichnet werden.

Als weiteres Beispiel für den Stoffwechsel der 1,4-Benzodiazepine soll die Biotransformation des Dikaliumchlorazepates dienen. Dikaliumchlorazepat (Tranxilium^{R}) wird im Organismus zu Desmethyldiazepam und Oxazepam umgewandelt. Man vermutet, daß diese beiden Metaboliten die wirksamen Substanzen des Chlorazepates sind[13]. Das Wirkungsspektrum ähnelt dem des Chlordiazepoxides und des Diazepams. Der Abbau läßt sich chemisch folgendermaßen beschreiben:

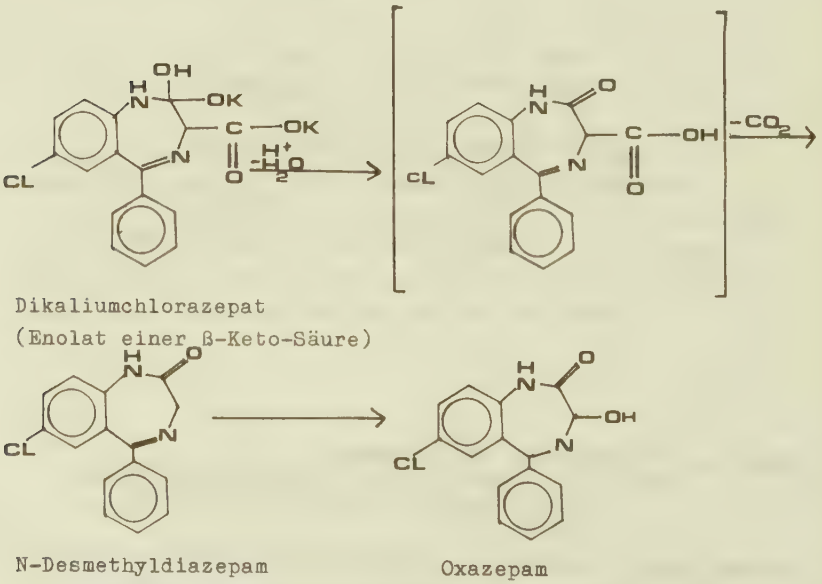
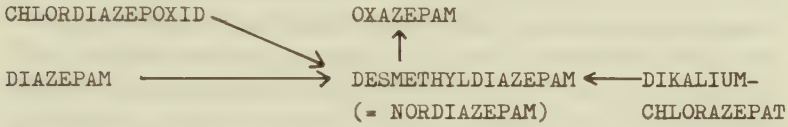


Abb. 12: Metabolismus des Dikaliumchlorazepates

Die Stoffwechselwege von Chlordiazepoxid, Diazepam und Dikaliumchlorazepat seien hier nochmals kurz schematisch zusammengefaßt:



Wie sich gezeigt hat, enden auch die Stoffwechselwege von Medazepam und Prazepam bei den Metaboliten Desmethyldiazepam und Oxazepam.

2.2.5. Der Einfluß anderer Stoffe auf den Metabolismus, die Wirkung und die Pharmakokinetik der 1,4-Benzodiazepine

Es gibt nur wenige Beispiele für Alterationen des Benzodiazepin-Metabolismus beim Menschen durch andere Substanzen. Leevy bemerkte, daß die Eliminierung von Chlordiazepoxid bei einem Alkoholiker mit fortgeschrittener Leberzirrhose deutlich verzögert war. Vermutlich war diese Beeinträchtigung eher auf die Erkrankung der Leber selber als auf den Alkohol zurückzuführen. Im allgemeinen benötigen Alkoholiker ohne schwere Leberschäden zur Sedierung größere Mengen von Benzodiazepinen als Normalpersonen. Vom Äthanol weiß man, daß es in der Leber die mikrosomalen Enzyme stimuliert, aber es ist nicht klar, ob bei diesen Patienten der Alkohol als Enzyminduktor agiert hat oder ob ihre Angst und Agitation so stark sind, daß sie eine höhere Medikation erfordern. In diesem Zusammenhang sei auch auf eine Studie von Shull und Mitarbeiter hingewiesen[14]. Dieser studierte bei seinen Patienten die Pharmakokinetik von Oxazepam. Von den 13 Patienten handelte es sich in 7 Fällen um solche mit einer akuten Virushepatitis und bei den übrigen um Patienten mit (alkoholbedingter) Leberzirrhose. Shull fand nun heraus, daß die Eliminierung des Oxazepam verglichen mit der der gesunden Kontrollgruppen normal war. In einer anderen Studie hatte sich gezeigt, daß die Ausscheidung von Diazepam in ähnlichen Fällen signifikant beeinträchtigt war.[15] Für diese Diskrepanz gibt Shull nun mehrere Erklärungen. Die interessanteste ist die, daß die Enzyme, die für den Metabolismus des Oxazepams verantwortlich seien, durch die Lebererkrankung funktionell nicht in dem Maße beeinträchtigt würden wie diejenigen, die im Metabolismus des Diazepams eine Rolle spielten. Bei den ersteren handelt es sich um Glukuronyltransferasen, bei den letzteren um mischfunktionelle Oxygenasen.

Wir sehen an diesen Beispielen, daß die teilweise indirekten Auswirkungen des Alkohols auf den Metabolismus

und die Wirkung der Benzodiazepine recht komplex sind und u.a. von Ausmaß und Dauer des Alkoholkonsums (bei der Entwicklung einer Leberzirrhose) und auch vom Benzodiazepinderivat selber abhängen.

Schließlich sei umgekehrt an die u.U. potenzierende Wirkung der Benzodiazepine auf den Alkohol erinnert.

Viala und Mitarbeiter stellten fest, daß bei einigen epileptischen Kindern, die ständig mit Diazepam behandelt wurden, die Blutspiegel von Desmethyldiazepam die Konzentrationen von Diazepam überschritten, wenn gleichzeitig Phenobarbital gegeben wurde. Ohne Phenobarbital überstiegen umgekehrt die Werte für Diazepam diejenigen des Desmethyldiazepam; diese Tatsache läßt darauf schließen, daß die durch Phenobarbital induzierte Enzymstimulierung die Bildung von Desmethyldiazepam erhöhen konnte.

Andere Stoffe, die (bei Tieren) den Benzodiazepin-Metabolismus stimulierten, waren DDT, Lynestrenol und Spironolacton.

Meyers und Mitarbeiter stellten fest, daß nach einer Langzeitbehandlung mit Nortriptylin die akute Toxizität von Chlordiazepoxid bei Tieren höher war als ohne diese Behandlung. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist die Beeinträchtigung des Arzneimittelmetabolismus durch Nortriptylin, die von Vesell et al. bei Menschen dokumentiert worden ist.

Soweit man bis jetzt feststellen konnte, besitzen die Benzodiazepine selber keine klinisch relevanten enzyminduzierenden Eigenschaften.

2.2.6. Wirkungsweise der Benzodiazepine - Neurophysiologie und Neuropharmakologie

Die große Bedeutung der Benzodiazepine als Anxiolytica, Antikonvulsiva und Muskelrelaxantien war Stimulans für eine intensive Erforschung der Pharmakologie dieser Substanzen. Obwohl dadurch inzwischen eine ganze Reihe gesicherter Fakten vorliegen, gibt es immer noch Bereiche, so zum Beispiel die biochemischen Wirkungen der Benzodiazepine, wo man noch nicht weit über das Stadium der Spekulationen und Hypothesen hinausgekommen ist.

Im allgemeinen nimmt man an, daß der Hauptangriffspunkt der Benzodiazepine im limbischen System liegt. Dieses ist die dem Hypothalamus direkt übergeordnete Zentrale des endokrinen und vegetativ-nervösen (-psychischen) Regulationssystems. Zu ihm gehören hauptsächlich phylogenetisch alte Strukturen: Hippocampus, Gyrus cinguli und Mandelkern (nucleus amygdalae).

Es verarbeitet die afferenten Signale aus dem Körperinneren und von der Umwelt über die Formatio reticularis ("visceral brain"). Die efferenten Bahnen laufen unter anderem über den Mandelkern. Vom limbischen System können angeborene Trieb- und Instinkthandlungen, die der Erhaltung der Art und des Individuums dienen, ausgelöst oder beeinflußt werden. Auch emotionelle Reaktionen wie Wut und Furcht nehmen von hier ihren Ausgang. Die Erregungskreislaufverhältnisse sind komplex und beinhalten vielfache reziproke Projektionen vom Mandelkern zum Hippocampus und zum Hypothalamus. Man nimmt an, daß der Mandelkern die hypothalamische Aktivität erhöht. Bei manchen Species hat die bilaterale Mandelkernextirpation ruhige und zahme Tiere zur Folge.

Die elektroenzephalographischen Veränderungen, die durch Benzodiazepine hervorgerufen werden, sind unter anderem von der Dosis abhängig; in Dosen, die zu Sedierung und Ataxie führen, herrschen Aktivitäten von hohem Potential und langsamen Wellen vor (ϑ, δ -Band des EEG), niedrigere Dosen bewirken einen Wechsel zu Hochfrequenz-Aktivi-

täten (ß-Wellen) mit niederem Potential. Auch subcortikale Strukturen zeigen in ihrer Aktivität Veränderungen. Die elektrische Spontanaktivität im Hippocampus der Ratte wird durch Chlordiazepoxid und Diazepam intraperitoneal gesenkt.

Die Antwort auf externe Stimuli wird noch mehr beeinflußt. Nitrazepam, Diazepam und Chlordiazepoxid reduzieren oder heben die Antwort des Hippocampus auf akustische, visuelle oder taktile Reize bei Katzen und Hasen auf. Die elektrische Stimulierung des Mandelkerns ruft bei der unbehandelten Katze eine sekundäre Antwort im ipsilateralen Hippocampus hervor. Benzodiazepine in Dosen von weniger als 1 mg/kg senken die Reaktion des Hippocampus auf diesen Reiz, während die Schwellen für die thalamocortikale Erregung unverändert sind. Greenblatt und Shader sprechen in diesem Zusammenhang von der "pharmakologischen Amygdalektomie", die durch die Benzodiazepine hervorgerufen wird.

Es sind auch Wirkungen auf die Funktion des Hypothalamus beschrieben worden. Die Wutreaktion, die bei Katzen und Affen durch Elektrostimulation des Hypothalamus hervorgerufen wird, kann durch Benzodiazepine aufgehoben werden. Die Elektrostimulation des Hypothalamus kann ebenfalls einen peripheren pressorischen Reflex und kardiale Arrhythmien auslösen. Die Vorbehandlung mit Benzodiazepinen hat kaum einen direkten Effekt auf den Blutdruck, aber der pressorische Reflex - als Folge der Stimulation des Hypothalamus - wird abgeschwächt oder aufgehoben. Die zentrale Natur dieses Effektes wird durch die Beobachtung bestätigt, daß der Pressorenreflex auf eine Noradrenalininfusion oder auf eine Reizung des Ganglion stellatum hin unverändert bleibt.

Zum Schluß sei hier eine Arbeit von Borbély und Mitarbeiter zitiert[16]. Diese schließen unter anderem aus ihren Versuchen, daß die Gegenwart von limbischen Strukturen für die sedierende Wirkung des Chlordiazepoxides nicht notwendig sei. Sie nehmen vielmehr an, daß diese Wirkung hauptsächlich durch einen inhibitorischen Effekt auf die Formatio reticularis bedingt sei.

Zahlreiche klinische Studien haben erwiesen, daß die Benzodiazepine muskelrelaxierende Eigenschaften haben. Dies trifft sowohl für gesunde Personen als auch für Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen zu. Bei Personen mit spastischen Skelettmuskelerkrankungen tritt nach Benzodiazepinbehandlung gewöhnlich eine Besserung ein. Objektive elektromyographische Untersuchungen haben diese Beobachtungen bekräftigt. Auch hier konnte gezeigt werden, daß diese Wirkungen in erster Linie zentral bedingt sind. Während in vitro sehr hohe Konzentrationen von Benzodiazepinen notwendig sind, um die muskuläre Funktion und die neuromuskuläre Erregungsleitung zu senken, genügen für eine zentrale Muskelrelaxation in vivo bereits sehr geringe Mengen. Ähnliches gilt auch für Reflexe. Monosynaptische Reflexe werden selbst durch hohe Dosen kaum beeinflußt, polysynaptische Reflexe hingegen werden schon durch relativ niedrige Mengen gedämpft. Man hat zeigen können, daß die polysynaptische Inhibition eher eine supraspinale als spinale Wirkung ist.

Die Benzodiazepine haben bedeutende antikonvulsive Eigenschaften. Sie können vor allem die bei kleinen Tieren durch Pentetrazol hervorgerufenen Krampfanfälle verhindern. Hier zeichnen sich besonders Clonazepam und Lorazepam durch starke Wirksamkeit aus; beide Derivate haben eine 2'-Chlor-Substitution am 5-Phenyl-Ring. Krampfanfälle, die durch maximalen oder minimalen Elektroschock erzeugt werden, werden erst durch wesentlich höhere Dosen beeinflußt. Theoretisch sind Anti-Pentetrazol-Effekte bei kleinen Tieren mit Anti-Petit mal-Wirkungen bei Menschen assoziiert, während Wirkungen, die durch Elektroschocks provozierte Anfälle verhindern, mit Anti-Grand mal-Eigenschaften korrelieren. Demnach müßten alle Benzodiazepine bei Petit mal-Epilepsie höchst wirksam sein, was aber bei Menschen nicht konsequenz beobachtet wurde. Generalisierte Krämpfe, die durch eine Vielzahl anderer Stoffe ausgelöst werden, können ebenfalls durch Benzodiazepine verhindert oder zum Stillstand gebracht werden. Dazu gehören unter anderem Bemegrid, Picrotoxin und Strychnin.

Von den Auswirkungen der Benzodiazepine auf das menschliche Elektroenzephalogramm (EEG) sei hier hervorgehoben, daß sie zu einem Wechsel von der Alpha-Aktivität zu einer Beta-Aktivität mit hoher Frequenz und niedrigem Potential führen. Diese Wirkung, die auch als "Librium-Effekt" bezeichnet wird, wird von einigen Autoren als gutes Korrelat zu der Fähigkeit der Benzodiazepine, anxiolytisch zu wirken, angesehen.

Verschiedene Autoren vermuten, daß die Benzodiazepine die im ZNS durch Gammaaminobuttersäure (GABA) vermittelte Hemmung der Neurone intensivieren[17, 18]. Man glaubt, daß Epileptiker niedrige GABA-Konzentrationen im ZNS haben. Saad konnte zeigen, daß Diazepam die GABA-Konzentrationen bei normalen Mäusen und solchen, bei denen es durch Isoniazid zu einer Verarmung an GABA im ZNS gekommen war, ansteigen ließ.

Die durch Picrotoxin erzeugten Krämpfe können, wie bereits angeführt wurde, durch Benzodiazepine verhindert oder zum Stillstand gebracht werden. Keller und Mitarbeiter[18] berichten, daß mit Benzodiazepinen den in ihren Versuchen bewirkten metabolischen Veränderungen durch Picrotoxin, das den Rezeptor für GABA blockiert, entgegengewirkt werden konnte.

In einer Arbeit über den Einfluß der Plasmaproteinbildung auf Verteilung und Wirkung der Benzodiazepine schreibt Müller[19], daß Benzodiazepine die Aminosäure L-Tryptophan aus ihrer Bindung an Serumalbunime über eine Kompetition um dieselbe Bindungsstelle verdrängen könnten. Da die Tryptophankonzentration im ZNS direkt der ungebundenen Tryptophankonzentration im Plasma proportional sei, führe die Verdrängung von Tryptophan aus der Plasmaproteinbindung durch die Benzodiazepine zu einer Erhöhung der Konzentrationen von Tryptophan und seiner beiden Metaboliten, Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure, im ZNS.

Diese Befunde unterstützten Vermutungen, daß zumindest die anxiolytische Wirkung der Benzodiazepine auf einem

Einfluß auf das serotoninerge System des ZNS beruhe. Da zu dieser pharmakologischen Wirkung jedoch relativ hohe Konzentrationen an Benzodiazepinen benötigt würden und da diese Wirkung nicht für Benzodiazepine spezifisch sei, könne hierzu noch nichts Abschließendes gesagt werden. Allerdings konnte in der Zwischenzeit der oben noch als Vermutung aufgestellte Zusammenhang zwischen inhibitorischer Funktion der Benzodiazepine und der Synthese von Gammaaminobuttersäure weiter bestätigt werden und darf nun wohl als allgemeingültig angesehen werden.

2.2.7. Anwendungsbereiche der Benzodiazepine

2.2.7.1. Emotionelle Störungen

Eine Übersicht über kontrollierte Studien mit Benzodiazepinen und Placebos bei ängstlichen Neurotikern läßt für Greenblatt und Shader die Überlegenheit dieser Pharmaka über Placebos erkennen. Dies scheint auch für den Vergleich mit älteren Anxiolytica (Barbiturate, Meprobamat etc.) zuzutreffen. Es scheint andererseits keinen Beweis dafür zu geben, daß irgendein Benzodiazepinderivat wirksamer ist, d.h. eine größere intrinsic activity hat, als irgendein anderes. Gelegentlich würden, so Greenblatt und Shader, die Vergleiche zwischen Benzodiazepinen durch fehlende Äquivalenz der Dosen oder pharmakokinetischer Eigenschaften verwirrt. Lader[20] erklärt sich diese fehlenden Unterschiede mit dem Stoffwechsel der Benzodiazepine, der ja bei vielen zu den gleichen Metaboliten (z.B. Desmethyldiazepam mit einer langen Halbwertzeit) führe. Eine Studie von Laffranchini sei dennoch erwähnt[21]. Dieser konnte für das neuere Bromazepam (Lexotanil^{R}) eine statistisch gesicherte größere Wirksamkeit verglichen mit Oxazepam demonstrieren.

Obwohl Benzodiazepine keine antidepressive Wirkung zeigen, können sie bei Patienten mit einer neurotischen Depression nützlich sein, besonders wenn Angst oder Agitiertheit herausragende Bestandteile der Krankheit sind.

Eine Anzahl von Autoren hat beobachtet, daß eine Langzeitpsychotherapie durch gleichzeitige Behandlung mit Benzodiazepinen wirksam ergänzt wird. In drei kontrollierten Studien, in denen Psychotherapie mit Pharmaka kombiniert wurde, kamen die Psychotherapie-plus-Benzodiazepin-Gruppen signifikant besser voran als diejenigen, die mit Psychotherapie plus Placebo behandelt wurden.

Es muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß Benzodiazepine nicht nur im Tierexperiment paradoxe Wirkungen zeigen

können. Greenblatt und Shader sprechen in diesem Zusammenhang von der pharmakologischen Enthemmung der "angstgebundenen" Feindseligkeit und weisen unter anderem auf eigene klinische Erfahrung in dieser Hinsicht hin.

2.2.7.2. Neurologie

Bei Kindern mit (perinatal erworbener) Zerebralparese sind ausgedehnte Studien mit Chlordiazepoxid und Diazepam durchgeführt worden. Annähernd 50 % dieser Kinder zeigten eine signifikante Besserung mit reduzierter Spastizität, Abnahme der unfreiwilligen Bewegungen und besserer Koordination. In vielen Fällen besserte sich das Verhalten und die Überaktivität nahm ab.

In Fällen mit (durch Trauma oder degenerative Erkrankungen) erworbener Spastizität, z.B. multipler Sklerose, Parkinsonismus, amyotrophischer Lateralsklerose, zerebrovaskulären Schäden und Rückenmarksverletzungen konnte Diazepam mit Erfolg eingesetzt werden[22].

Auch bei leichteren, reversiblen Störungen, z.B. bei Muskelzerrungen, Verrenkungen und Muskelspasmen, die mit Schmerzen verbunden waren, erwiesen sich die muskelrelaxierenden Eigenschaften der Benzodiazepine neben der konservativen Therapie als heilsam.

Die Therapie des Tetanus konnte mit der Einführung des Diazepams wesentlich verbessert werden. Norredam und Hainau verglichen ihre Erfahrungen mit dieser Erkrankung vor und nach dem Januar 1967. Bei 159 Fällen, die vor diesem Datum behandelt worden waren, war Pentobarbital als Sedativum und Muskelrelaxans eingesetzt worden. Die Letalität hatte sich auf 67 % belaufen und bei 82 % der Patienten war eine Tracheotomie erforderlich gewesen. Nach dem Januar 1967, als Diazepam das Pentobarbital ersetzte, betrug die Letalität in 142 Fällen 39 %, und nur 15 % der Patienten benötigten eine Tracheotomie.

Bei der Behandlung der infantilen Spasmen und der myoklonischen Epilepsie gilt heute Nitrazepam als das Mittel der Wahl. Vergleiche zwischen Nitrazepam und Diazepam zeigten, daß Nitrazepam noch wirkungsvoller war und bei 60 - 80 % der Patienten eine komplette oder teilweise Kontrolle über die Anfälle bewirkte.

Greenblatt und Shader kommen mit anderen Autoren zu dem Schluß, daß Diazepam intravenös zur Zeit das Mittel der Wahl zur Behandlung des Status epilepticus und unbehandelbarer Anfälle sei. Sie betonen, daß jedes intravenöse Sedativum in diesem Fällen gewisse Risiken in sich birge, daß aber die Benzodiazepine von allen verfügbaren Mitteln diejenigen mit dem geringsten Risiko seien.

Wenn Diazepam intravenös gegeben wird, zeigt es starke muskelrelaxierende, sedierende und anterograd-amnestische Wirkungen, die schnell einsetzen und von kurzer Dauer sind. Es scheint ein geeignetes Mittel zur Einleitung der Elektrokrampftherapie (Elektroschock) zu sein. Allerdings sind Injektionsschmerz und eine folgende Phlebitis häufige Komplikationen.

Zum Schluß seien einige Bemerkungen über das relativ neue Clonazepam erlaubt. Dieses ist ein Analoges zum Nitrazepam und unterscheidet sich von ihm nur durch eine 2'-Chlor-Substitution am 5-Phenyl-Ring mit einem dadurch resultierenden Zuwachs an Wirkungsstärke. Es scheint ein hochwirksames Antikonvulsivum zu sein. Der meiste Erfolg ist bei der Behandlung des Petit mal und dessen Varianten erzielt worden; einige Patienten mit vorher unbeeinflußbaren Anfällen dieses Typs sind durch Clonazepam eindrucksvoll unter Kontrolle gebracht worden. Die Nebenwirkungen sind ähnlich wie bei anderen Benzodiazepinderivaten. Es traten bei den meisten Patienten Somnolenz, Müdigkeit und Koordinationsstörungen auf, die aber spontan nachließen oder durch langsame Erhöhung oder leichte Verminderung der Dosen unter Kontrolle gebracht werden konnten. In einigen Fällen mußte die Therapie mit Clonozepam wegen auftretender Agitation, Verwirrung und Aggressivität abgebrochen werden[23]. Eine Studie von Caccia berichtet von dem erfolgreichen Einsatz des Clonazepams bei der Behandlung der idiopathischen Trigeminusneuralgie[24].

2.2.7.3. Innere Medizin

Bei der Behandlung des akuten Myokardinfarktes kommt der Anxiolyse eine besondere Bedeutung zu. Diazepam, intravenös gegeben, bringt eine sichere, angenehme Sedierung und reduziert den Bedarf an Analgetika[25]. Der Myokardinfarkt stellt eine Streß-Situation dar, die von erhöhten Plasmakonzentrationen an Katecholaminen, freien Fettsäuren und Cortisol begleitet wird. Erhöhte Plasmakonzentrationen an Katecholaminen können ventrikuläre Arrhythmien und einen kardiogenen Schock auslösen. Hohe Plasmaspiegel von freien Fettsäuren führen vermehrt zu Arrhythmien und erhöhen den Sauerstoffbedarf des Myokards. Melsom vermutet, daß die Streßreaktion durch Diazepam abgeschwächt wird[25]. Er konnte zeigen, daß die Konzentration an Katecholaminen bei mit Diazepam behandelten Patienten signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe lagen. Diazepam führte außerdem zu einem rascheren Abfall der erhöhten Fettsäurespiegel.

Im Status asthmaticus verschlimmert Angst durch existenzbedrohende Atemnot jeden Anfall. Medikamentöse Anxiolyse, z.B. mit Diazepam intravenös, ist hier unbedingt erforderlich[26].

Bei Patienten mit Lebererkrankungen und drohender hepatischer Dekompensation wird häufig Agitation beobachtet. Sedativa können in solchen Fällen ein hepatisches Koma auslösen, zumal die Elimination der meisten Sedativa und Analgetika eingeschränkt ist. Shull und Mitarbeiter[14] konnten zeigen, daß die Pharmakokinetik des Oxazepams aus bereits besprochenen Gründen (vgl. Abschnitt 2.2.5.) bei akuter Virushepatitis und Leberzirrhose unbeeinflußt ist und halten deshalb dieses Mittel bei solchen Patienten für brauchbar.

2.2.7.4. Gynäkologie und Geburtshilfe

Eine ganze Anzahl von nicht kontrollierten Studien geben zu verstehen, daß die Benzodiazepine für ängstliche Patientinnen in der Gynäkologie und Geburtshilfe von Nutzen sind. Darin eingeschlossen sind Patientinnen mit erkennbarer symptomatischer Angst, prämenstrueller Spannung, Dysmenorrhoe, Dyspareunie, klimakterischen Symptomen und eine Reihe weiterer psychosomatischer Störungen. Fromhagen berichtete über eine kontrollierte Studie mit Chlordiazepoxid und Placebo bei einer großen Zahl ängstlicher Frauen. Die Überlegenheit des Chlordiazepoxides über Placebo in Hinblick auf die Gesamtbesserung und die (phobischen und somatischen) Zielsymptome war hoch signifikant.

In einem Vortrag von Artner über Psychopharmaka in Gynäkologie und Geburtshilfe wird unter anderem auf die Bedeutung des Diazepams für die schmerzarme optimale Geburt hingewiesen[27)].

2.2.7.5. Anästhesie und Chirurgie

Benzodiazepine sind sowohl für die orale als auch für die parenterale präoperative Medikation (Prämedikation) geeignet. Brandt und Mitarbeiter verglichen Chlordiazepoxid (20 - 50 mg) und Diazepam (20 mg) mit Pentobarbital (100 mg) und Placebo. Die Arzneimittel wurden am Abend vor dem chirurgischen Eingriff und wiederum 90 Minuten vor der Narkose per os gegeben. Alle drei Pharmaka erlaubten einen besseren Schlaf als Placebo. Der globalen Auswertung des Anästhesisten zufolge war Chlordiazepoxid mit Pentobarbital vergleichbar, wohingegen Diazepam sowohl dem Pentobarbital als auch dem Placebo überlegen war. Mehr als die Hälfte der Diazepam-Empfänger hatte bei der Einleitung der Narkose eine Amnesie - für die Prämedikation ein wünschenswerter Effekt -, während dies bei den mit Pentobarbital und Placebo vorbehandelten Patienten zu weniger als einem Viertel zutraf. Alle aktiven Pharmaka erwiesen sich nach der Auswertung durch den Beobachter und die Patienten gegenüber Placebo überlegen. Eine ganze Reihe von Studien hat auch die Überlegenheit von Diazepam intramuskulär (10 - 20 mg) über Placebo bewiesen. Die Erfahrung mit Diazepam auf dem Gebiet der Narkoseeinleitung sind zahlreich. Zu diesem Zwecke wird Diazepam solange intravenös gegeben, bis Dysarthrie und Sedierung eintreten. Die dazu notwendigen Dosen variieren stark von Patient zu Patient und reichen von 5 mg bis 60 mg oder mehr. Wenn vorher zur Prämedikation Opiate, Scopolamin oder Tranquilizer gegeben wurden, sind geringere Mengen an Diazepam erforderlich. Wenn einmal Sedierung und Dysarthrie erreicht worden sind, nehmen beinahe alle Patienten die Gesichtsmaske ohne Erregung oder Abwehrbereitschaft an. Im Gegensatz zur Behandlung mit Barbituraten sind die Patienten auch in diesem Stadium aufweckbar. Ein weiterer Nachteil der Barbiturate besteht darin, daß sie leichter zu Apnoe führen.

Benzodiazepine scheinen sich auch als postoperative Psychosedativa zu bewähren. Mehrere Autoren berichten, daß die häufig nach Narkosen mit Ketamin auftretenden unangenehmen psychotomimetischen Reaktionen und Empfindungen durch Diazepam günstig beeinflußt würden.

Megens und Zwart berichten über den erfolgreichen Einsatz von Diazepam intravenös während der Reposition von Frakturen und Luxationen[28]. Sie kommen zu dem Schluß, daß dank des Zusammenwirkens von hypnotischem und muskelrelaxierendem Effekt und der anterograden Amnesie die Behandlung mit Diazepam i.v. als mindestens der Lokalanästhesie ebenbürtig angesehen werden könne. Von 17 Patienten, die früher schon einmal anästhesiert worden waren, beurteilten 13 die Behandlung mit Diazepam i.v. als angenehmer.

2.2.7.6. Alkoholismus und andere Abhängigkeitszustände

Benzodiazepine wurden früher häufig bei der Behandlung des akuten Alkoholentzugssyndroms angewandt. Guerrero-Figueroa und Mitarbeiter und Goldstein wiesen in Tierversuchen nach, daß Diazepam bzw. Chlordiazepoxid die durch Alkoholentzug ausgelösten Erscheinungen (z.B. epileptiforme Aktivitäten im EEG) sofort beseitigen bzw. mildern konnten.

Der klinische Gebrauch der Benzodiazepine beim Alkoholentzug ist in vielen Berichten beschrieben worden. Chlormethiazol (Distraneurin^{R}) ist aber bei der Behandlung der Entzugssyndrome den Benzodiazepinen überlegen und heute das Mittel der Wahl[29]. Wie aus Übersichten von Viamontes und Greenblatt und Shader hervorgeht, scheint der chronische Alkoholismus im allgemeinen (erwartungsgemäß) gegenüber der Behandlung mit Pharmaka (darin eingeschlossen die Benzodiazepine) refraktär zu sein.

Es gibt nur wenige Berichte über die Behandlung des Barbiturat-Entzugssyndroms mit Benzodiazepinen. Norton konnte im Experiment zeigen, daß die durch Barbituratentzug bei der Ratte erzeugten Krämpfe durch Chlordiazepoxid verhindert werden.

Diazepam scheint für die Behandlung des Opiat-Entzugssyndroms geeignet zu sein. In Tierversuchen konnte das Entzugssyndrom bei morphinabhängigen Mäusen durch Gabe von Diazepam (7,5 - 50 mg/kg) vollständig unterdrückt werden. Litt und Mitarbeiter benutzten Diazepam (40 mg täglich) als einzige Therapie zur Entgiftung von 85 jugendlichen Heroinsüchtigen. Die Ergebnisse waren gleichförmig gut. Bei 17 von 18 Kindern, die von heroinsüchtigen Müttern geboren worden waren, konnten allein durch die Gabe von Diazepam (bis 6 mg pro Tag) die Entzugssyndrome beherrscht werden.

Levy hat beschrieben, daß sich Diazepam wie ein spezifisches Antidot bei "bad trips" nach LSD-Gebrauch verhält.

2.2.7.7. Schlaf

Die Benzodiazepine sind weit verbreitete Schlafmittel. Im Vergleich zu Barbituraten und deren Analoga besitzen sie folgende Vorzüge[30]:

1. sie verändern das Schlafmuster kaum;
2. die Gefahr einer akuten Vergiftung bei Überdosierung ist minimal;
3. ihre enzyminduzierende Wirkung ist gering.

Während Barbiturate eine "schlaferzwingende" Wirkung haben, könnte man bei den Benzodiazepin-Tranquilizern von einer durch affektive Dämpfung bewirkten Schlafinduktion ("schlafanstoßende" Wirkung) sprechen[31].

In erster Linie werden Nitrazepam (Mogadan^{R}) und Flurazepam (Dalmadorm^{R}) verschrieben. Nach Greenblatt und Shader und Kesson et al.[32] ist diese Bevorzugung nicht gerechtfertigt, da auch andere Benzodiazepine als Schlafmittel wirkten. Es sind also nicht pharmakodynamische, sondern (allenfalls) pharmakokinetische Gesichtspunkte, welche die beiden genannten Substanzen bei geeigneter, verhältnismäßig niedriger Dosierung als Hypnotika in vielen Fällen brauchbar erscheinen lassen[33].

Kontrollierte Studien mit Placebo zeigen, daß Nitrazepam als schlafinduzierendes Agens dem Placebo überlegen ist. Verglichen mit der inaktiven Medikation, verlängert Nitrazepam die totale Schlafzeit, verkürzt die Zeit bis zum Schlafbeginn, reduziert die Aufwachfrequenz und verbessert die subjektive Qualität des Schlafes. Orale Dosen von 5 oder 10 mg sind wirksam.

Mit Ausnahme eines Unterschiedes in der Wirkungsstärke scheint Flurazepam dem Nitrazepam als Schlafmittel ebenbürtig zu sein. Auch hier erweist sich in allen Qualitäten die Überlegenheit über Placebo. Dosen von 15 oder 30 mg sind wirksam, wobei die größere Dosis keinen größeren Nutzen zu bringen scheint.

Der REM-Schlaf wird nach den üblichen Dosen nicht oder nur wenig verändert. Dagegen wird das Stadium 4(E) des Tiefschlafs unterdrückt. Da in diesem Stadium manchmal schwere Angstträume auftreten, müßten Benzodiazepine hier gerade günstig sein.

EEG-Untersuchungen geben ein gutes, objektives Kriterium für die Wirkungsdauer von Schlafmitteln. Die schnelle Beta-Aktivität wird erhöht, die Amplitude des EEG erniedrigt. Die im Stadium 4 auftretenden langsamen Wellen werden reduziert. Trotzdem wird die Sekretion von Wachstumshormon, die für Stadium 4 charakteristisch ist, nicht gehemmt. Die Pharmakokinetik der beiden besprochenen Substanzen wurde bereits in Abschnitt 2.1. behandelt.

Bei beiden Pharmaka ist die Wirkungsdauer wegen der langen Plasmahalbwertzeiten der Muttersubstanzen und der pharmakologisch aktiven Metaboliten nicht auf die Nacht beschränkt. Im übrigen scheint besonders Flurazepam, wenn es über mehrere Tage hinweg hintereinander eingenommen wird, zu akkumulieren. Immerhin behielt Flurazepam in einer Studie von Kales und Mitarbeiter im Gegensatz zu den Vergleichssubstanzen Chloralhydrat, Glutethimid, Methaqualon und Secobarbital als einziges Mittel über 4 Wochen hindurch seine Wirksamkeit als Hypnotikum.

Schließlich sei auf eine Studie von Castleden und Mitarbeiter hingewiesen[34]. Diese konnten zeigen, daß die Empfindlichkeit für Nitrazepam bei älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren Individuen erhöht ist. Aufgrund ihrer Resultate kommen sie zu der Annahme, daß diese erhöhte Empfindlichkeit nicht pharmakokinetisch bedingt sei, sondern nur durch eine erhöhte Ansprechbarkeit des alternden Gehirns erklärt werden könne. Untersuchungen mit den ähnlich metabolisierten Antidepressiva durch Nies et al.[35] und Hesse et al.[36] zeigen, daß alte Patienten mit kleineren Dosen vergleichbare Serumspiegel im steady state erreichen wie jüngere Patienten, daß also hier auch pharmakokinetische Effekte eine Rolle spielen können.

2.3. Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Eine Reihe von Nebenwirkungen der Benzodiazepine auf das Zentralnervensystem wurde bereits erwähnt. Eine unerwünschte Wirkung besteht z.B. darin, daß Benzodiazepine, wenn sie als Schlafmittel eingenommen werden, ihre Wirkung unter Umständen noch am nächsten Tage zeigen, was sich in Müdigkeit und eingeschränkter Leistungsfähigkeit ausdrücken kann (sog. "hang over"). Eine ausgeprägte Depression des Zentralnervensystems durch Benzodiazepine kann viele Formen annehmen, darunter Muskelschwäche, Ataxie, Dysarthrie, Inkoordination, Diplopie, verschwommenes Sehen, Verwirrung, Apathie, Schwindel und Somnolenz.

Nach Greenblatt und Shader sind die häufigsten Nebenwirkungen bei Chlordiazepoxid und Diazepam Somnolenz und/ oder Ataxie mit einer Häufigkeit von 3 bis 10 %. Sie sind von der Dosis abhängig.

Bei manchen Individuen erzeugen die Benzodiazepine statt der Sedierung eine Stimulierung. Maguire und Mitarbeiter beispielsweise berichten von einem Patienten mit einem Hyperkinesie- und Agitiertheits-Syndrom, das offensichtlich durch Chlordiazepoxid ausgelöst worden war. Die Autoren erklären, daß diese paradoxe Stimulierung durch Chlordiazepoxid wahrscheinlich bei denjenigen Patienten vorkäme, die bei leichten Angstzuständen hohe Dosen dieses Mittels bekämen.

Viscott beschreibt 7 Patienten, die nach Einnahme von Chlordiazepoxid kurz vor dem Einschlafen Halluzinationen bekamen. Andere Autoren berichten über vermehrtes Auftreten von Träumen und Alpdrücken im Zusammenhang mit Nitrazepam.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß derartige paradoxe Reaktionen nur vereinzelt vorkommen. In manchen Fällen sind sie jedoch so stark, daß sie zum Abbruch der Therapie mit dem betreffenden Mittel zwingen (siehe bei Clonazepam in Abschnitt 2.2.7.2.).

Ein Nachteil der intravenösen Verabreichung von Diazepam besteht darin, daß sich an der Injektionsstelle in manchen Fällen schmerzhafte Phlebitiden entwickeln. In einer Studie von Langdon bekamen von 328 Patienten, die Diazepam intravenös als Prämedikation erhalten hatten, 23 (7 %) eine Phlebitis.

Aus einer Übersicht von Almeyda über (allergische) Hautreaktionen auf Chlordiazepoxid geht hervor, daß diese die Form einer Urtikaria, eines angioneurotischen Ödems oder makulopapulärer Eruptionen annehmen können.

Im allgemeinen scheinen die Benzodiazepine keine schädigenden Wirkungen auf die Leber zu haben. Es gibt auch zur Zeit keinen Hinweis darauf, daß sie beim Menschen zu einer klinisch relevanten Enzyminduktion führen.

Die Auswirkungen der Benzodiazepine auf das Herz-Kreislauf-System sind ebenfalls klinisch nicht von Bedeutung. Berry[37] untersuchte die Auswirkungen von Diazepam auf das isolierte Herz von Hühnerembryonen und fand, daß Diazepam erst in hohen Konzentrationen, wie sie beim Menschen nicht erreicht werden, sowohl die Pulszahl als auch die Kontraktionsamplitude reduzierte.

Schädigende Einflüsse auf das blutbildende System werden in der Literatur nur vereinzelt berichtet. Haerten und Pöttgen[38] referieren z.B. über einen Fall von Leukopenie, die sie dem Gebrauch von Oxazepam bzw. Diazepam zuschreinen, allerdings handelte es sich nicht um eine Monotherapie.

Eine Anzahl von Studien über zytogenetische Effekte der Benzodiazepine zeigen, daß diese, zumindest in therapeutischen Dosen, keine schädigenden Wirkungen auf die Chromosomen haben. Das teratogene Potential der Benzodiazepine scheint, wenn es überhaupt vorhanden ist, sehr gering zu sein. Safra und Oakley[39] berichten von einem möglichen Zusammenhang zwischen Lippenspalten mit oder ohne Gaumenspalten und der Einnahme von Diazepam im ersten Trimenon der Schwangerschaft.

Alle Sedativa und Hypnotika haben eine atemdepressorische Wirkung; dies gilt auch für die Benzodiazepine. Benke und Mitarbeiter[40] fanden, daß Flunitrazepam (0,03 mg/kg i.v. während 2 Min.) bei lungengesunden Probanden zu einer Hypo-Hyperventilation mit signifikant erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck, erhöhtem P_{CO_2} und respiratorischer Azidose führte. Allerdings kam es in keinem Fall zu einer Apnoe, es sei denn, daß vorher Pethidin gegeben worden war. In anderen Studien waren ähnliche Resultate erzielt worden. Es muß jedoch angefügt werden, daß die in den hier genannten Fällen geschilderte atemdepressorische Wirkung der Benzodiazepine, obwohl statistisch signifikant, klinisch unbedeutend war. Ähnliches gilt auch für Patienten mit chronischen obstruktiven Lungenerkrankungen.

Benzodiazepine können zu Gewöhnung (Toleranz), psychischer Abhängigkeit (Gewohnheitsbildung) und u.U. auch zu physischer Abhängigkeit (Sucht) führen. Nach langer Einnahmedauer in hohen Dosen kann es bei abruptem Abbruch der Einnahme zu einer Entzugssymptomatik kommen.

In der medizinischen Literatur gibt es bisher keine Berichte über tödliche Ausgänge nach alleiniger Benzodiazepin-Überdosierung.

Absolute Kontraindikationen für die Therapie mit Benzodiazepinen sind Myasthenia gravis und Ataxie[41]. Weitere Kontraindikationen sind wegen der potenzierenden Wirkung die akute Alkohol-, Opiat- und Schlafmittelintoxikation (z.B. durch Barbiturate) und gleichzeitiger Alkoholgenuß.

2.4. Erfahrungen mit Clobazam

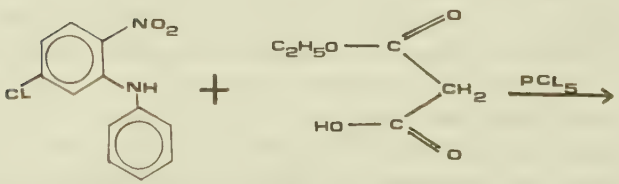
Clobazam ist das erste 1,5-Benzodiazepinderivat, das im Handel erschienen ist und mit dem inzwischen auch schon einige klinische Erfahrungen gesammelt worden sind.

Ein weiteres 1,5-Benzodiazepinderivat ist Triflubazam, das noch einmal kurz im 3. Abschnitt dieser Arbeit erwähnt wird.

Die Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen über 1,5-Benzodiazepine als Tranquilizer und über Clobazam im besonderen nimmt seit den letzten Jahren stetig zu.

Eine Kuriosität in Zusammenhang mit dieser Dissertation ist eine Arbeit von Grieco et al.[42], die sich mit Strukturaktivitätsbeziehungen von 1,5-Benzodiazepinderivaten in Hinblick auf gegen grampositive Bakterien gerichtete Aktivitäten befaßt.

Kuch[43] zeigt in seiner Arbeit einen Syntheseweg für Clobazam, der anders als für die 1,4-Benzodiazepine beschrieben verläuft. 1,5-Benzodiazepine erhält man durch die Reaktion von 2-Nitrodiphenylaminen mit den entsprechenden Derivaten der Malonsäure. Für Clobazam sieht das folgendermaßen aus:



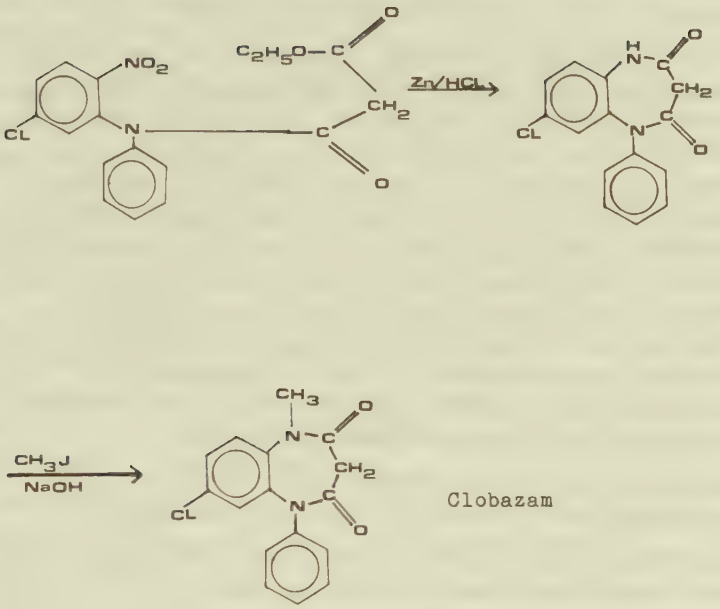


Abb. 13: Synthese des 1,5-Benzodiazepins Clobazam
Aus: H. Kuch, Clobazam: Chemical aspects of the 1,4 and 1,5-benzodiazepines 43)

In derselben Arbeit wird am Beispiel von Clobazam und Diazepam auf die Unterschiede im chemischen Verhalten zwischen den 1,4- und 1,5-Benzodiazepinen eingegangen. Diese bestehen in der Basizität, Lipophilie und Elektronenladungsverteilung. Beispielsweise hat das 1,4-Benzodiazepin Diazepam eine schwach basische Imino-Gruppe im Gegensatz zu den sauren Methylen-Protonen von Clobazam und die Imino-Funktion von Diazepam ist lipophiler als die Carboxamid-Gruppierung des Clobazam mit ihrem ziemlich hydrophilen Charakter.

Mit den im folgenden zitierten Veröffentlichungen soll kurz auf bisher gewonnene Erfahrungen mit Clobazam in Pharmakologie und Klinik eingegangen werden.

In einer Studie von Barzaghi et al.[44] über pharmakologische und toxikologische Eigenschaften von Clobazam heißt es, daß diese Substanz bei Mäusen einen sedativen Effekt in viel niedrigeren Dosen als denjenigen, die Ataxie verursachen, erreiche. Sie senke die spontane Motoraktivität, reduziere das Explorationsverhalten und verstärke sowohl die Äthanol- als auch die Hexobarbital-Narkose. Clobazam sei auch wirksam in der Verhütung des Kämpfens isolierter Mäuse und im Pfoten-Elektroschock-Test; weiterhin zeige sich eine deutliche antikonvulsive Aktivität gegen Metrazol, Elektroschockkrämpfe und Strychnin. In all diesen Versuchsmodellen sei Clobazam stärker wirksam als Chlordiazepoxid gewesen.

Bei Katzen würden keine bemerkenswerten autonomen oder ungünstigen kardiovaskulären Effekte festgestellt.

In akuten und chronischen Toxizitätsuntersuchungen habe sich dieses Psychosedativum als gut verträglich und weniger toxisch als Chlordiazepoxid erwiesen.

In teilweise kontrollierten klinischen Studien konnte die anxiolytische und sedierende Wirkung von Clobazam u.a. auch bei psychosomatischen Erkrankungen demonstriert werden[45-52].

In einer Studie von Del Soldato[49] zeigt Clobazam auf der Hamilton-Skala (rating scale for anxiety states) im Vergleich mit Diazepam bei den verschiedenen Symptomen nach der Behandlung häufiger eine signifikante Besserung als Diazepam.

Bei Chappa[50] wird gezeigt, daß Clobazam im Vergleich mit anderen Benzodiazepinen (Diazepam) mehr einen anxiolytischen als hypnotischen Effekt aufweist.

Einige Studien legen nahe, daß sich die Einnahme von Clobazam nicht nachteilig auf die Leistungsfähigkeit und Vigilanz und vor allem auf die Fahrtüchtigkeit (u.a.

am Fahrsimulator gemessen) auswirkt[53-58].

Sticht und Käferstein[59] hingegen teilen mit, daß ihre Versuchsteilnehmer übereinstimmend von einer Ermüdung berichteten, die etwa eine Stunde nach der Einnahme von Clobazam, also während der Medikamentenanflutungsphase, am stärksten ausgeprägt war und dann wieder abklang, obwohl die Serumspiegel sich nur relativ wenig änderten. Sie halten zumindest in der Medikamentenanflutungsphase eine negative Wirkung von Clobazam auf die Fahrtüchtigkeit nicht für ausgeschlossen. - Der Hersteller von Clobazam dagegen gibt an, daß dieses bei therapeutischer Dosierung eine ausgeprägte anxiolytische Wirkung aufweise, ohne Tagesmüdigkeit zu verursachen.

Nach Clarke et al.[60] scheint die Wirkung als Schlafmittel (ebenso wie bei dem 1,5-Benzodiazepin Triflubazam) auf die Nacht beschränkt zu sein.

Bei einigen Personen, besonders bei den ängstlichen, scheint es bei gewissen Tests die Leistungsfähigkeit sogar zu steigern[58].

Abschließend sei eine pharmakokinetische Studie von Rupp erwähnt[61]. Aus dieser geht hervor, daß es bei gleichzeitiger Einnahme von Nomifensin (einem Antidepressivum) und Clobazam zu keiner wechselseitigen Beeinflussung von Absorption, Verteilung und Ausscheidung der Substanzen kommt.

Abbildung 14 zeigt den durchschnittlichen Serumspiegelverlauf von Clobazam und Norclobazam bei 10 Personen während der Einnahme von 2 x 10 mg Clobazam täglich über 28 Tage. Man sieht, daß im steady state die Konzentrationen des Norclobazam wesentlich höher liegen als die von Clobazam und daß nach dem Einnahmestop Norclobazam wesentlich langsamer den Intravasalraum verläßt.

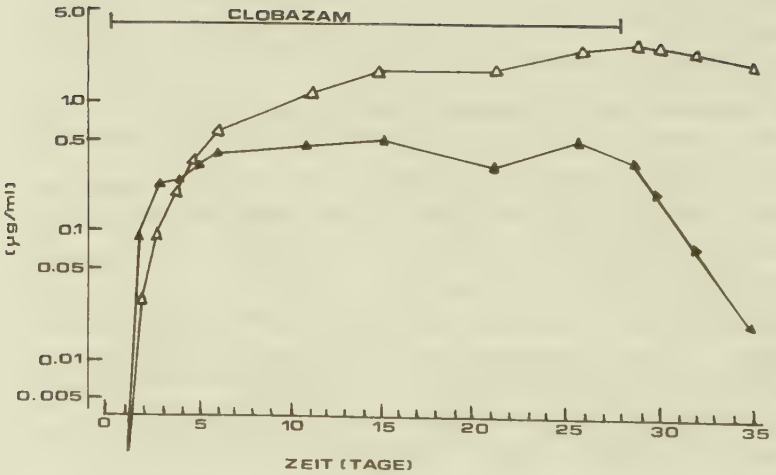


Abb.14: Serumspiegel von unverändertem Clobazam (▲) und N-Desmethylclobazam (△) nach der Einnahme von Clobazam 10 mg zweimal täglich über 28 Tage. Mittelwerte von 10 Personen. Gaschromatographische Meßmethode.
Aus: Rupp, W. et al.: Pharmacokinetics of single and multiple doses of clobazam in humans[87]

3. Experimenteller Teil

3.1. Nachweisverfahren für Benzodiazepine

Entsprechend ihrer großen klinischen Bedeutung gibt es inzwischen in der Literatur eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit sehr verschiedenen Nachweismethoden für Benzodiazepine aus den Körperflüssigkeiten wie Serum oder Urin beschäftigen. Von den diversen Verfahren des qualitativen und/oder quantitativen Nachweises der Benzodiazepine bzw. ihrer pharmakologisch aktiven Metaboliten seien hier genannt: Polarographie[62], Fluorimetrie[63], UV-Spektrophotometrie[64], qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie[65], Kolorimetrie[66], Gaschromatographie[67-73], Flüssigkeitschromatographie[74-78] und Radioimmunoassay[79].

Eine umfangreiche Übersicht über die Chromatographie der verschiedenen 1,4-Benzodiazepinderivate gibt Hailey[80]. Bei den von ihm zitierten Arbeiten handelt es sich in den meisten Fällen um Verfahren der Dünnschicht- und der Gaschromatographie.

Clifford und Smyth geben in einer Arbeit eine Zusammenstellung sämtlicher Nachweismethoden für 1,4-Benzodiazepine[81]. Aus diesen beiden im Jahre 1974 veröffentlichten Übersichten ist zu entnehmen, daß die Dünnschichtchromatographie und die Gaschromatographie die am häufigsten angewandten chromatographischen Analysenmethoden für den Nachweis von 1,4-Benzodiazepinen sind. Eigene Untersuchungen in der einschlägigen Literatur ergaben, daß dies, zumindest für die Gaschromatographie, auch zum jetzigen Zeitpunkt noch gilt.

Die beiden Methoden basieren gewöhnlich darauf, daß die einzelnen Benzodiazepine mit Säure zu den entsprechenden Benzophenonen hydrolysiert werden, ehe man sie chromatographisch bestimmt. Man tut dies aus folgendem Grund: Während die unveränderten Substanzen ohne Derivatisierung nur im Mikrogramm-Bereich nachgewiesen werden können, werden für diese im Nanogramm-Bereich Adsorptionsprozesse

bedeutsam, was besonders für die N-Desalkyl-Verbindungen gilt. Ebenso kommt es zu photolytischer Zersetzung[80]. Für die zu den entsprechenden Benzophenonen derivatisierten Substanzen treffen diese Einschränkungen nicht zu, d.h. daß diese auch im Nanogramm-Bereich nachweisbar sind. Diese Methoden können jedoch dann nicht diejenigen Benzodiazepinmoleküle unterscheiden, die dasselbe Benzophenonderivat liefern; zum Beispiel werden Chlordiazepoxid, Oxazepam und Desmethyldiazepam alle zu 2-Amino-5-chlorbenzophenon hydrolysiert[81].

Die Entwicklung der modernen Hochdruckflüssigkeitschromatographie in den letzten Jahren wird deswegen von den Analytikern begrüßt, da biologische Metaboliten oder auch Pharmaka oft polar, nicht flüchtig und manchmal thermolabile Verbindungen sind, die eine Analyse durch die Gaschromatographie lästig oder bisweilen unmöglich machen[75,82]. Ein weiterer Vorteil der Flüssigkeitschromatographie besteht in der beträchtlich höheren Geschwindigkeit der Analyse und der höheren Empfindlichkeit. Während bei Macek[76] die Laufzeit bei der Papierchromatographie ungefähr 150 Minuten betrug (mit Formamid-Systemen), bei der Dünnschichtchromatographie 30 - 40 Minuten und bei der Gaschromatographie ungefähr 20 Minuten, belief sich die Laufzeit bei der Flüssigkeitschromatographie auf 7 - 15 Minuten. Bei Flachbettechniken lag die Nachweisempfindlichkeit bei ungefähr 0,5 - 1 µg, während bei der Säulenflüssigkeitschromatographie die Grenzen bei 20 - 300 ng lagen, wenn ein UV-Detektor mit einer konstanten Wellenlänge von 254 nm benutzt wurde[76]. Triflubazam, das wie Clobazam ein 1,5-Benzodiazepin ist, wurde in den oben angeführten Arbeiten von Bailey und Shroff[65,67] und Huettemann und Shroff[77] mittels Dünnschicht-, Gas- und Flüssigkeitschromatographie analysiert.

3.2. Material, Methoden und Resultate

3.2.1. Meßgeräte

Die Messungen in der Gaschromatographie wurden mit dem Gerät L 350 (Siemens, Karlsruhe) mit stickstoffspezifischem Flammenionisationsdetektor (N-FID) durchgeführt.

Es wurden Trennsäulen von 1m und 3m Länge mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Füllung aus 1 % OV-101 auf Gas Chrom Q (100 - 120 mesh) benutzt.

Als Schreiber diente das Gerät Kompensograph III (Siemens).

Die Messungen in der Flüssigkeitschromatographie erfolgten mit dem Gerät S 200 (Siemens, Karlsruhe); als Detektor diente das Photometer PM 4 (Zeiss, Oberkochen).

Später wurde das Gerät S 100 (Siemens, Karlsruhe) mit Photometerdetektor PM 2 D (Zeiss, Oberkochen) und Hochdruckschaltventil benutzt.

Es wurden Stahlsäulen von 10 cm und 30 cm Länge, gefüllt mit Lichrosorb SI 100, 3 - 5 µ Teilchengröße (Merck, Darmstadt) verwendet. Dabei war im S 100 eine Säule von 10 cm Länge vor dem Schaltventil, eine Säule von 30 cm Länge hinter dem Schaltventil gemäß folgender Skizze angeordnet:

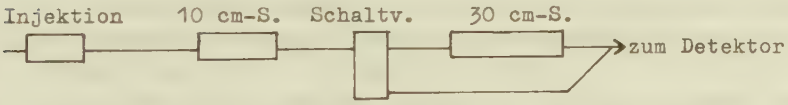


Abb. 15: Anordnung der beiden Säulen und des Schaltventils im Flüssigkeitschromatographen S 100

Als Schreiber wurde ebenfalls das Gerät Kompensograph III benutzt.

Die Chromatogramme, die zum Erstellen der ersten drei Eichkurven benötigt wurden, wurden mit dem Integrator CRS-304/30 (Infotronics Ltd., Shannon, Irland) ausgewertet. Die Analyse der Chromatogramme aus den Extrakten und den Serumproben wurde mit dem Integrator CDS 111 (C)

(Varian, Darmstadt) durchgeführt. Ebenso wurde die Säulenschaltung von diesem Integrator übernommen.

3.2.2. Benzodiazepine bzw. deren Metabolite

Es wurde das Verhalten folgender Benzodiazepinderivate (Metabolite) untersucht: Clobazam, Norclobazam, Diazepam, Nordiazepam und Lorazepam.

3.2.3. Chemikalien

Die in Abschnitt 3.2.2. aufgeführten Stoffe wurden von den Herstellern zur Verfügung gestellt und ohne weitere Reinigung verwendet. NaCl und Na_2CO_3 wurden in analysenreiner Form von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen.

3.2.4. Lösungsmittel und Fließmittel

Dichlormethan (CH_2Cl_2) und Hexan wurden aus technischer Ware durch sorgfältige Destillation gereinigt, Äthanol wurde über Na-Pb-Legierung (DRI-Na^R, Baker, Groß-Gerau) destilliert (K.P. = 78°C) und Propanol, tertiäres Butanol und Morpholin wurden analysenrein bezogen und direkt verwendet.

3.2.5. Vorläufige Messungen

3.2.5.1. In der Gaschromatographie

Es wurden sowohl die 1 m-Säule als auch die 3 m-Säule verwendet. Als Trägergas diente Stickstoff, als Brenngas ein Wasserstoff-Luft-Gemisch.

Die Temperatur der Säule wurde zwischen 200 und 290°C variiert, die Temperatur am Injektionsblock, und die Detektortemperatur betrug bei den meisten Analysen 300°C. Die Durchflußrate des Trägergases (N_2) betrug 14 ml/min. Der N-FID wurde durch Variation der Brenngase auf optimale Empfindlichkeit eingestellt. Für qualitative Untersuchungen reichte es, beliebige Mengen von Clobazam, Norclobazam, Lorazepam und Diazepam in Äthanol zu lösen. Es wurden Lösungen hergestellt, die jeweils nur eines der genannten Pharmaka enthielten und eine Lösung, die alle vier Stoffe gleichzeitig enthielt. Von den Lösungen wurden Volumina von 0,5 bzw. 2,0 µl mit einer Mikroliterspritze (S.G.E., über Fa. Werner Günther Analysentechnik, Darmstadt, bezogen) in den Gaschromatographen eingespritzt.

3.2.5.2. In der Flüssigkeitschromatographie

Es wurden zwei Stammlösungen mit genauer Einwaage hergestellt. Die mit der Halbmikrowaage abgewogenen Mengen wurden mit Äthanol in Meßkolben übergespült, anschließend wurde mit Dichlormethan auf 100 ml aufgefüllt. Die erste Stammlösung enthielt 19,61 mg Diazepam/100 ml CH_2Cl_2, die zweite ein Gemisch aus Clobazam (20,02 mg/100 ml), Nordiazepam (38,19 mg/100 ml) und Norclobazam (86,05 mg/100 ml).

Im folgenden wurden vier Eichlösungen (in den Kolben A, B, C und D) hergestellt. In jeden der vier Kolben wurden 5 ml der ersten Stammlösung (Diazepam als interner Standard) pipettiert. Zusätzlich wurden von der zweiten Stammlösung in den Kolben A 1 ml, in den Kolben B 2 ml, in den Kolben C 5 ml und in den Kolben D 10 ml pipettiert. Anschließend wurden die Kolben mit CH_2Cl_2 auf 100 ml aufgefüllt.

Von den Eichlösungen wurden dann mit der Mikroliterspritze jeweils ca. 50 µl entnommen, in eine Einführ-

pipette übergespült und in den Flüssigkeitschromatographen S 200 eingegeben. Dieser nimmt 20 µl pro Probe auf.

Arbeitsbedingungen: Das Fließmittel war folgendermaßen zusammengesetzt: CH_2Cl_2: 250 ml, tertiäres Butanol: 15 ml, Morpholin: 0,50 ml, H_2O: 1 ml und Hexan ad 1000 ml. Der Durchfluß betrug 1 ml/min, was einen Druck von ca. 100 bar entspricht. Die Wellenlänge des Detektors war auf 244 nm eingestellt.
Anmerkung: UV-Detektoren werden wegen ihrer relativ geringen Anfälligkeit gegenüber Schwankungen der Temperatur und der Strömungsgeschwindigkeit in der schnellen Flüssigkeitschromatographie sehr häufig benutzt[85]. Die hier eingestellte Wellenlänge liegt in der Nähe der Absorptionsmaxima von Clobazam (bei 232 nm und 292 nm) und Norclobazam (bei 229 nm und 293 nm)[88] und dürfte somit für den Nachweis der beiden Substanzen ausreichen.

3.2.6. Vorläufige Ergebnisse

3.2.6.1. In der Gaschromatographie

Bei den meisten Analysen unter verschiedenen Bedingungen zeigte sich, daß die Retentionszeiten von Clobazam, Lorazepam und Diazepam kaum voneinander abwichen. Die Retentionszeiten hingen reziprok mit der Säulentemperatur zusammen: höhere Temperaturen im Säulenraum verkürzten die Verweildauer und umgekehrt, niedrigere Temperaturen verlängerten sie. Bei einer Säulentemperatur von 300°C und einer Detektortemperatur von 300°C ließen sich Clobazam, Lorazepam und Diazepam relativ gut voneinander trennen. Norclobazam hingegen ließ sich unter diesen Bedingungen nicht analysieren. Auf die Problematik des gaschromatographischen Nachweises der N-Desalkyl-Verbindungen wurde bereits in der Arbeit von Hailey[80] hingewiesen. Wahrscheinlich kam es auch hier zu den angesprochenen Adsorptionsprozessen. Es zeigte sich ferner, daß die Signalausbeute von der Säulenlänge abhing. Die Ausbeute bei der 3 m-Säule war geringer als die bei der Säule von 1 Meter Länge. Wahrscheinlich zersetzten sich die Substanzen unter den Bedingungen der Gaschromatographie. Die Nachteile der Gaschromatographie, die sich unter anderem aus der Thermolabilität mancher Stoffe ergeben, wurden in den Arbeiten von Chan und Mitarbeiter[75] und Nelson[82] schon angeführt. Da es aber ein Ziel dieser Arbeit war, Clobazam und seinen wichtigsten Metaboliten, Norclobazam, parallel mit einem Verfahren nachzuweisen, mußte angesichts dieser Resultate die gaschromatographische Methode zugunsten der Hochdruckflüssigkeitschromatographie verlassen werden. Eine Auswegmöglichkeit in der Gaschromatographie hätte vielleicht in der Derivatisierung der Substanzen (z.B. durch Säurehydrolyse) bestanden, was jedoch das Verfahren aufwendiger gemacht hätte.

3.2.6.2. In der Flüssigkeitschromatographie

Unter den angegebenen Bedingungen wurden brauchbare Ergebnisse erzielt. Die vier Substanzen ließen sich relativ gut voneinander trennen. Von den einzelnen Eichlösungen wurden jeweils fünf bzw. drei Messungen hintereinander durchgeführt. Die gute Reproduzierbarkeit der Analysen hinsichtlich der Retentionszeiten fand ihres Ausdruck in einer geringen Standardabweichung bzw. einem niedrigen Variationskoeffizienten (unter 5 %). In einem Diagramm erhielt man beim Auftragen der vom Integrator erhaltenen relativen Peakflächen (relativ zu Diazepam als internem Standard mit der Peakfläche "1") gegen die ansteigenden Konzentrationen der drei Psychopharmaka (bzw. deren Metaboliten), nämlich Clobazam, Norclobazam und Nordiazepam, Punkte, die annähernd auf Geraden lagen; es bestand also zwischen den ansteigenden Konzentrationen und den registrierten relativen Peakflächen Linearität. Abbildung 16 zeigt ein typisches Flüssigkeitschromatogramm. Abbildung 17 zeigt das Diagramm. Wie man sieht, schneiden die drei durch das Verfahren der linearen Regression berechneten Geraden nahe beim Nullpunkt die Ordinate. Der Korrelationskoeffizient liegt in allen Fällen nahe bei 1.

Zu dem hier angewandten Verfahren der Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist zu sagen, daß es sich um eine Verteilungschromatographie handelt.

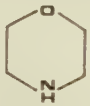
Es liegt ein Vierkomponenten-Zweiphasensystem vor mit einer polaren stationären und einer unpolaren mobilen Phase. Wir haben eine wasserreiche lipophobe stationäre Phase mit Kieselgel als polarem Träger, die sich ständig durch das dem Fließmittel zugefügte Wasser regeneriert.

Es stellt sich ein Gleichgewicht mit der wasserarmen lipophilen mobilen Phase ein, die vorwiegend aus Dichlormethan und Hexan besteht. Dichlormethan und Hexan haben den Vorteil, daß sie preiswert sind und im

UV-Bereich bis 230 nm eine ausreichende Transparenz besitzen.

Der Alkohol (tertiäres Butanol) dient als Lösungsvermittler. Er schließt die Mischungslücke zwischen den wenig polaren Verbindungen Methylenchlorid und Hexan und dem stark polaren Wasser.

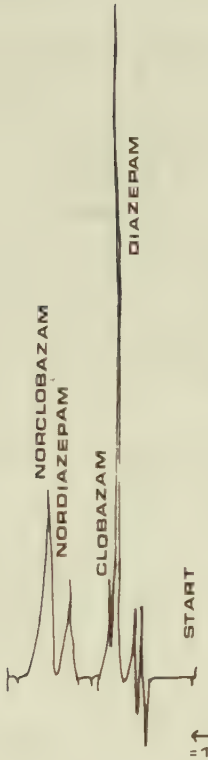
Morpholin (10), dessen Formel hier wiedergegeben ist, hat die Aufgabe, die sauren Zentren des Kieselgels abzublocken.



10

Aus dem Chromatogramm (Abb. 16) ist ersichtlich, daß die polareren Verbindungen, nämlich Norclobazam und Nordiazepam (ihnen fehlt ja in Position 1 die Methylgruppe), länger in der Trennsäule verweilen, d.h. daß sie sich länger in der polaren Phase aufhalten als die weniger polaren Moleküle Diazepam und Clobazam. Clobazam wiederum ist, wie in Kapitel 2.4. gezeigt wurde, hydrophiler, d.h. polarer als Diazepam und Norclobazam schließlich ist polarer als Nordiazepam. In Arbeiten von Hesse und Hövermann[83] und Hesse et al.[84] wird näher auf Theorie und Praxis des Zweiphasensystems in der Verteilungschromatographie eingegangen, und es finden sich dort auch Literaturhinweise zu diesem Thema. In den zitierten Arbeiten werden ternäre und quaternäre Zweiphasensysteme (Dreikomponenten- und Vierkomponenten-Zweiphasensysteme) beschrieben. Eine ausführliche Erörterung zum Gegenstand 'Verteilungschromatographie' erfolgt in der Monographie 'Hochdruckflüssigkeitschromatographie' von Engelhardt[85].

Für eine quantitative Analyse, insbesondere unter erschwerten Bedingungen, wie wir sie bei Analysen aus dem Serum vorfinden, wenn gleichzeitig noch andere Substanzen vorhanden sind (Pharmaka), war die Trennung der Substanzen noch nicht weit genug. Hierzu mußte die Methode, wie später noch ausführlich beschrieben werden wird, weiter verbessert werden. Auf jeden Fall mußte das Trennsystem verlängert werden, jedoch so, daß nicht die Nachteile bei zu langer Verweildauer der Substanzen in den Trennsäulen zum Tragen kamen wie schlechte quantitative Nachweisbarkeit bei spät eluierten Stoffen mit breiten und niedrigen Peaks.



Retentionszeiten:

Diazepam:	125 s.
Clobazam:	143 s.
Nordiazepam:	205 s.
Norclobazam:	239 s.
Säulenlänge:	10 cm

Abb. 16: Hochdruckflüssigkeitschromatogramm unter den in Kapitel 3.2.5.2. angegebenen Bedungungen. Das Fließmittel hat Raumtemperatur

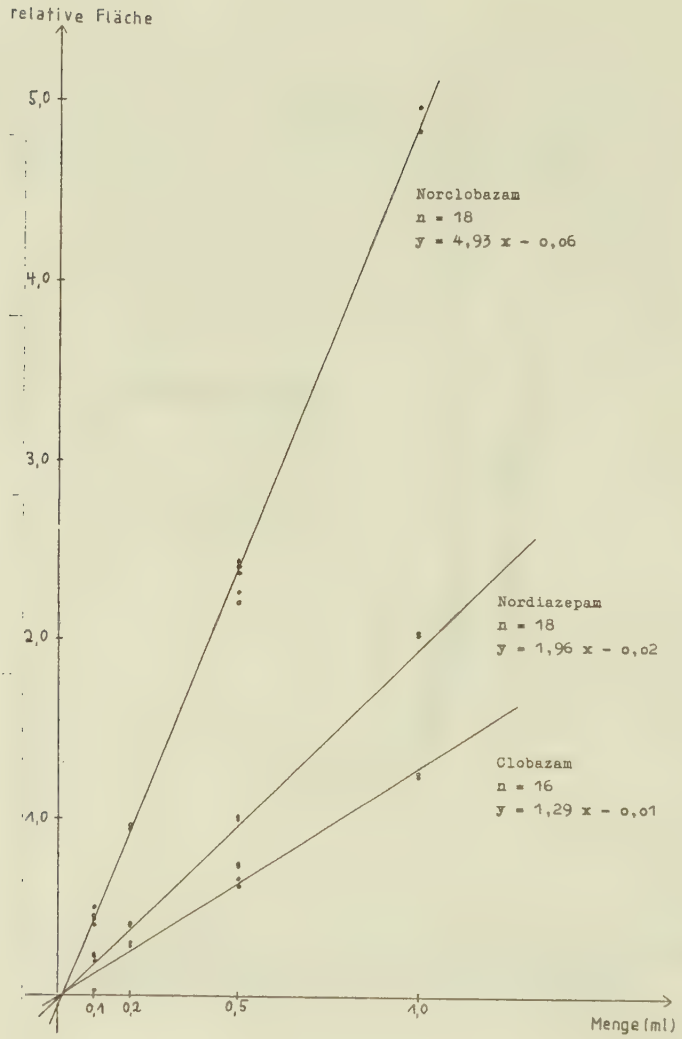


Abb. 17: Eichkurven für Norclobazam, Nordiazepam und Clobazam. Auftragen der relativen Mengen (ml) gegen die relativen Flächen. Norclobazam: n = 18, y = 4,93 x - 0,06, Nordiazepam: n = 18, y = 1,96 x - 0,02, Clobazam: n = 16, y = 1,29 x - 0,01.

3.2.7. Extraktionen aus der wässrigen Phase

Es wurden zunächst zwei Stammlösungen mit genauer Einwaage hergestellt. Der erste Meßkolben enthielt 6,60 mg Diazepam als internen Standard, der zweite die Proben Clobazam (14,50 mg) und Norclobazam (16,60 mg). Beide Kolben wurden mit Äthanol auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Von diesen beiden Stammlösungen wurden je 1 ml in zwei weitere Meßkolben pipettiert. Anschließend wurde mit Aqua dest. wiederum auf 100 ml aufgefüllt. Die beiden Arbeitslösungen enthielten somit 660 ng Diazepam/ml beziehungsweise 1450 ng Clobazam und 1660 ng Norclobazam/ml. Mit diesen beiden Arbeitslösungen stellten wir dann eine Eichreihe wie folgt her:

Erlenmeyerkolben	Standard	Probe	H_2O
Nr. 1	0 ml	0 ml	19,5 ml
Nr. 2	1 ml	0 ml	18,5 ml
Nr. 3	1 ml	0,1 ml	18,4 ml
Nr. 4	1 ml	0,2 ml	18,3 ml
Nr. 5	1 ml	0,3 ml	18,2 ml
Nr. 6	1 ml	0,5 ml	18,0 ml
Nr. 7	1 ml	0,6 ml	17,9 ml
Nr. 8	1 ml	1,0 ml	17,5 ml
Nr. 9	1 ml	2,0 ml	16,5 ml

Zur Alkalisierung auf pH 8,0 wurden in jeden der Erlenmeyerkolben 200 µl 10 %ige Sodalösung pipettiert. Bei diesem pH liegen alle drei Moleküle in neutralem Zustand vor. Außerdem wurden in jede Lösung 2 Löffel NaCl (ca. 3 g) gegeben. Das Kochsalz hat einen Aussalzeffekt, d.h. es entzieht den organischen Stoffen das Wasser.

Der Inhalt der Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von ungefähr 20 ml wurde daraufhin auf Extraktionssäulen Extrelut^{R} der Fa. Merck (Darmstadt) gegeben. Anschließend wurde 15 Min. gewartet. Während dieser Zeit verteilten sich die wässrigen Proben in den mit körnigem Trägermaterial gefüllten Säulen als stationäre Phase auf

der porösen Matrix. Die Säulen wurden dann mit 2 x 20 ml einer Mischung von 1 Teil iso-Propanol und 9 Teilen Dichlormethan aus einem Kippdosierer eluiert. Dabei wurden die lipophilen Verbindungen aus der wässrigen Phase in das organische Lösungsmittelgemisch extrahiert.
Ein ähnliches Extraktionsverfahren, ebenfalls mit Extraktionssäulen Extrelut^{R}, wird übrigens in der Arbeit von Harzer[78)] beschrieben. - Das Eluat in den Rundkolben wurde im Vakuum eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand zur Einengung mittels Pipettierhilfe und Eppendorf-Pipette mit 3 x 1 ml des Dichlormethan-iso-Propanolgemisches in ein Reaktionsgefäß übergespült. Diese Lösung wurde erneut im Vakuum eingedampft, der Rückstand jeweils in 100 µl Fließmittel aufgenommen und anschließend in den Chromatographen S 100 eingegeben. Dieser nimmt ebenfalls 20 µl pro Probe auf. Das Fließmittel wurde in seiner Zusammensetzung für eine noch bessere Trennung der drei Benzodiazepine etwas verändert. Statt des tertiären Butanols wurde n-Propanol genommen. Sein Anteil und der des Dichlormethans wurden etwas verringert. Die Zusammensetzung war wie folgt: 1,1 % n-Propanol, 23 % CH_2Cl_2, 0,05 % Morpholin, 0,1 % Wasser und 75,75 % Hexan. Die übrigen Arbeitsbedingungen waren die gleichen, wie beim Chromatographen S 200 in Abschnitt 3.2.5.2. Hinzu kam allerdings die Möglichkeit der Einflußnahme auf die Trennung der Substanzen durch Hintereinanderschaltung zweier Trennsäulen, wie sie in Abbildung 14 schematisch dargestellt wurde. Hierauf wird im folgenden Abschnitt noch näher eingegangen.

3.2.8. Optimierung des Trennsystems - Definitive Ergebnisse der flüssigkeitschromatographischen Messungen ("in vitro-Messungen") - Erstellen der Eichkurven -

Die Flüssigkeitschromatographie hatte sich, wie wir in Abschnitt 3.2.6.2. zeigen konnten, prinzipiell als geeignet erwiesen, unser Problem zu lösen, d.h. durch sie konnten Clobazam und Norclobazam nebeneinander quantitativ und qualitativ erfaßt werden. Es lag also nahe, diesen Weg weiter zu verfolgen.

Bevor wir an den direkten Nachweis der beiden Pharmaka aus dem Serum von Patienten gehen konnten, mußte zunächst "in vitro" getestet werden, ob das Verfahren in der Lage ist, die beiden Stoffe auch nach Extraktion aus der wässrigen Phase, in der sie ja auch im Plasma vorliegen, nachzuweisen. - Das Extraktionsverfahren wurde im vorigen Abschnitt beschrieben. -

Im übrigen mußten die Konzentrationen der Proben so gewählt werden, wie sie tatsächlich im Plasma nach therapeutischen Dosen vorliegen. Diese Konzentrationen liegen bei den Benzodiazepinen nach den bisherigen Erfahrungen im Nanogramm-Bereich. Durch die im vorigen Kapitel beim Herstellen der Eichreihe beschriebene Verdünnung erreichten wir bei den einzelnen Proben Mengen, die zwischen 145 und 3320 ng lagen. Der Konzentrationsbereich war also breit genug gefächert. Außerdem hatten wir in Kapitel 3.2.6.2. gesehen, daß die Trennung der Substanzen auf der (kurzen) 10 cm-Säule vor allem für die Bedingungen im Serum mit u.U. vorhandenen Begleitstoffen wie anderen Pharmaka etc. nicht ausreichend gewesen wäre, weil die einzelnen Stoffe zu rasch hintereinander eluiert wurden. Eine bessere Trennung konnte nur durch eine Vergrößerung des Trennsystems, also eine Verlängerung des Säulenweges, erzielt werden. Jedoch mußte dabei gleichzeitig darauf geachtet werden, daß sich für relativ polare Substanzen, wie z.B. Norclobazam, mit einer längeren Verweildauer in der Säule nicht die Nachteile einer zu langen Retentionszeit bemerkbar machten. Die Aufgabe

bestand also darin, das Trennsystem für unsere Fragestellung zu optimieren und einen Mittelweg zwischen einem zu "kurzen" und einem zu "langen" Trennweg zu finden.

Für diese Erfordernisse mußte das Nachweisverfahren also verändert werden. Eine Möglichkeit dies zu tun, lag bei dem Gerät S 100 in der bereits beschriebenen Säulenschaltung. Durch diese ist es möglich, die genannten Stoffe auf Grund des längeren Säulenweges (40 cm statt 10 cm) besser chromatographisch zu trennen, gleichzeitig aber auch Stoffe zu analysieren, die wie Diazepam, Clobazam und Norclobazam aufgrund eines (relativen) Unterschiedes in der elektrischen Ladung bei dem längeren Säulenweg sogleich sehr unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen, es kann also trotz des notwendigen längeren Trennsystems ein größerer Polaritätsbereich bei den zu analysierenden Verbindungen erfaßt werden. Die Säulenschaltung gestattet somit den Nachweis von Substanzen, die sonst aufgrund eines relativ großen Unterschiedes in der Polarität und der dadurch bedingten stark unterschiedlichen Retentionszeiten quantitativ kaum parallel in einem chromatographischen Arbeitsgang nachgewiesen werden können, weil das polarere Molekül sich wesentlich länger in der polaren stationären Phase aufhält und erst wesentlich später eluiert wird als das weniger polare, was wiederum eine Verbreiterung und Abflachung des Peaks und damit eine Verschlechterung der quantitativen Nachweisbarkeit nach sich zieht.

In unserem Falle war das am stärksten polare Molekül Norclobazam, wie bereits in Abschnitt 3.2.6.2. anhand des Chromatogrammes in Abbildung 16 gezeigt werden konnte. Sein Peak erscheint zeitlich nach denen von Diazepam, Clobazam und Nordiazepam am Schluß des Chromatogramms. Die Säulenschaltung erlaubt nun folgendes:
Wenn man zunächst den langen Weg wählt, also die Hintereinanderschaltung der kurzen Säule (10 cm Länge) und der langen Säule (30 cm Länge), erreichen die weniger polaren Moleküle, also in diesem Falle Diazepam und Clobazam,

über die kurze Säule die lange Säule bereits zu einem Zeitpunkt, bei dem sich das polare Molekül, also Norclobazam, noch in der kurzen Säule befindet. Wird nun das Hochdruckschaltventil betätigt, so wird der Durchfluß zur langen Säule abgeschaltet; die Substanzen, die sich in der langen Säule befinden, stehen nicht mehr unter Druck und verweilen an der Stelle, wo sie sich bei Betätigung des Schaltventils gerade befunden haben, während Norclobazam aus der kurzen Säule eluiert wird und auf direktem Wege zum Detektor gelangt. Nachdem der Norclobazampeak auf dem Chromatogramm erschienen ist, wird das Schaltventil wieder so betätigt, daß die lange Säule erneut unter Druck steht und die dort verbliebenen Substanzen, Diazepam und Clobazam, schließlich auch eluiert werden. Sie erscheinen somit zeitlich später auf dem Chromatogramm als das Norclobazam; die Verhältnisse heben sich also umgekehrt. Dadurch, daß das Norclobazam relativ früh erfaßt wird, wird sein Peak, relativ zur Gesamtdauer des Chromatogramms, schmäler, d.h. aber auch, daß seine Erfassungsgrenze niedriger wird. Kurz gesagt, das Nachweissystem wird für Norclobazam empfindlicher.

Mit dem oben geschilderten Kunstgriff erzielten wir direkt gute Ergebnisse. Abbildung 18 zeigt ein typisches Chromatogramm. Die Ventilschaltungen sind durch Pfeile markiert. Durch die lange Gesamtstrecke der beiden Säulen (40 cm) ließen sich auch Diazepam und Clobazam wesentlich besser trennen als auf der 10 cm-Säule im S 100. Der Integrator CDS 111 (C) (Fa. Varian) rechnete die für Clobazam und Norclobazam gefundenen Peakflächen direkt in absolute Werte um. Tabelle I zeigt für Clobazam und Norclobazam den Vergleich zwischen der Einwaage und den gefundenen Werten. Wie man sieht, korrelieren die Meßergebnisse stark mit den eingewogenen Werten. Die Abbildungen 19 und 20 stellen die Verhältnisse graphisch dar. Die Korrelationskoeffizienten für Clobazam und Norclobazam sind in beiden Fällen annähernd gleich 1. Die absolute Erfassungsgrenze für Norclobazam liegt bei dieser Methode bei 50 ng, für Clobazam ist sie noch etwas günstiger.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier gewählten Verfahren der Extraktion und der chromatographischen Analyse für Clobazam und Norclobazam optimal zu sein scheinen und die besten Voraussetzungen für erfolgreiche "in vivo"-Anwendungen bei Analysen aus dem Serum mitbringen.

	C L O B A Z A M		N O R C L O B A Z A M	
ml Lösung	Einwaage in ng	gefunden in ng	Einwaage in ng	gefunden in ng
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0,1	145	197	166	221
0,1	145	190	-	-
0,1	145	191	-	-
0,2	290	357	332	351
0,2	290	313	332	285
0,2	290	313	-	-
0,2	290	321	-	-
0,3	435	444	498	433
0,3	435	454	498	563
0,5	725	725	-	-
0,5	725	721	-	-
0,6	870	903	996	1026
0,6	870	898	996	941
1,0	1450	1284	-	-
2,0	2900	2945	3320	3302

Tabelle I: Vergleich zwischen der Einwaage und den gefundenen Werten

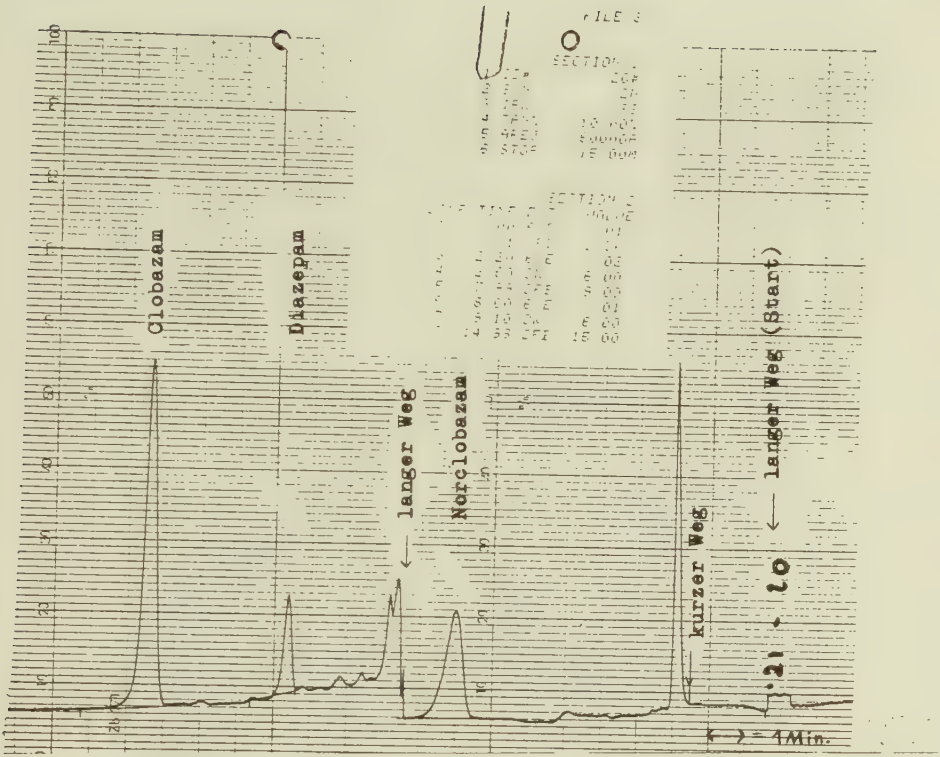


Abb. 18: Flüssigkeitschromatogramm nach Extraktion aus der wässrigen Phase

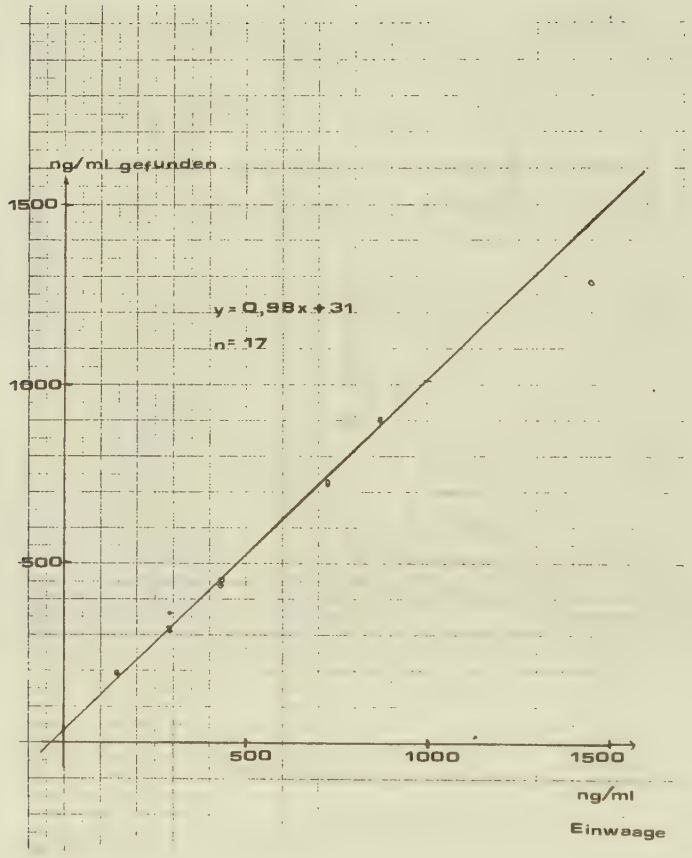


Abb. 19: Vergleich der Einwaage an Clobazam mit dem Meßergebnis.
n = 17, die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$y = 0{,}98\ x + 31$

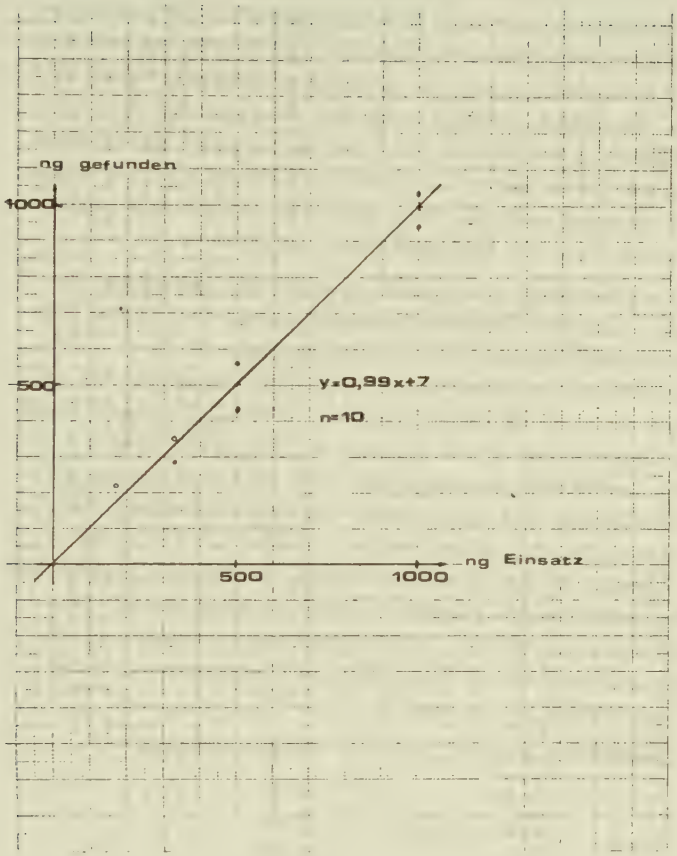


Abb. 20: Vergleich der Einwaage an Norclobazam mit dem Meßergebnis.
n = 10,
y = 0,99 x + 7

3.2.9. Extraktionen aus dem Serum

17 Patienten im Alter zwischen 32 und 82 Jahren aus der Praxis eines praktischen Arztes in Köln, die wegen Schlafstörungen, nervöser Erschöpfung oder Depressionen mit 1 oder 2 x 1 Tablette Frisium^{R}10 (Clobazam) pro die behandelt wurden, wurde im nüchternen Zustand 10 ml Venenblut entnommen. Dieses ließ man zunächst gerinnen, zentrifugierte es in der üblichen Weise und führte dann jeweils ca. 3 ml Serum in Plastikgläschen, die mit einem Stopfen versehen waren, über und fror die Proben dann im Kühlschrank bis zum Zeitpunkt der Analyse ein.

Vor der flüssigkeitschromatographischen Bestimmung des Clobazam- und Norclobazam-Spiegels wurde das Serum folgendem Extraktionsverfahren unterworfen:
1,00 ml Serum aus jeder Probe wurde mit jeweils 100 µl Standard (= 2000 ng Nor-Diazepam), 200 µl 10 %iger Sodalösung (K_2CO_3) und 18 ml Wasser auf Extrelut^{R}-Säulen (Merck, Darmstadt) gegeben und nach 20 Min. mit 60 ml eines Gemisches aus Essigester und Dichlormethan (CH_2Cl_2) extrahiert. Anschließend wurde das Eluat, wie bereits unter Abschnitt 3.2.7. beschrieben, im Vakuum eingedampft, der Rückstand wurde eingeengt, erneut eingedampft und anschließend in 100 µl Fließmittel aufgenommen und in den Chromatographen S 100 (Siemens) eingegeben. Dieser nimmt pro Probe 20 µl auf.

Das Fließmittel setzte sich wie folgt zusammen:

Äthanol	4 %
Dichlormethan	30 %
Hexan	66 %
Morpholin	0,5 %

Außerdem wurde wie früher bei der Herstellung des Fließmittels Wasser bis zur bleibenden Trübung (Sättigung) zugesetzt. Anschließend erfolgte noch die Filtration durch ein Faltenfilter. Statt des früher gebrauchten Alkohols n-Propanol verwendeten wir nun Äthanol, mit

dem noch günstigere Ergebnisse erzielt werden konnten. Im übrigen entsprachen die Arbeitsbedingungen denen der früheren hochdruckflüssigkeitschromatographischen Analysen. Eine Enteiweissung des Blutserums vor der Analyse entfällt, da die Serumeiweisse bei dem oben beschriebenen Extraktionsverfahren nicht mit aus der wässrigen Phase extrahiert werden.

3.2.10. Ergebnisse der flüssigkeitschromatographischen Analysen aus Human-Seren ("In vivo-Messungen")

Unter den oben angegebenen Bedingungen erzielten wir brauchbare Resultate. Tabelle II zeigt die für die einzelnen Patienten gemessenen Werte von Clobazam und Norclobazam. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen Chromatogramme von zwei verschiedenen Proben, die für die Meßreihe insgesamt typisch waren.

Proben-Nr.	Patientenbezeichnung	Clobazam ng/ml	Norclobazam ng/ml
1	F.,G. w. 55 J.	293	91
2	D.,A. w. 54 J.	529	185
3	S.,K. w. 57 J.	300	600
4	M.,E. w. 75 J.	265	630
5	S.,E. w. 65 J.	1508	233
6	Z.,R. w. 68 J.	1717	858
7	B.	-	177
8	B.,S. w. 82 J.	nicht auswertbar	
9	K.,A. w. 32 J.	96	68
10	K.,E. w. 64 J.	136	52
11	K.,H. m. 53 J.	201	481
12	K.,T. m. 59 J.	207	151
13	L.,U. w. 41 J.	68	482
14	N.,S. w. 78 J.	128	241
15	S.,M. w. 76 J.	159	122
16	W.,B. w. 69 J.	40	249
17	Y.,M. m. 45 J.	87	68

Tabelle II: Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Clobazam und Norclobazam aus dem Blutserum von 17 Patienten. Interner Standard: 100 µl = 2000 ng Nor-Diazepam je Probe. Die Auswertung der Peak-Flächen erfolgte automatisch durch den Integrator CDS 111 (C) (Varian, Darmstadt).
Mittelwerte: Clobazam 382 ng/ml
Norclobazam 293 ng/ml

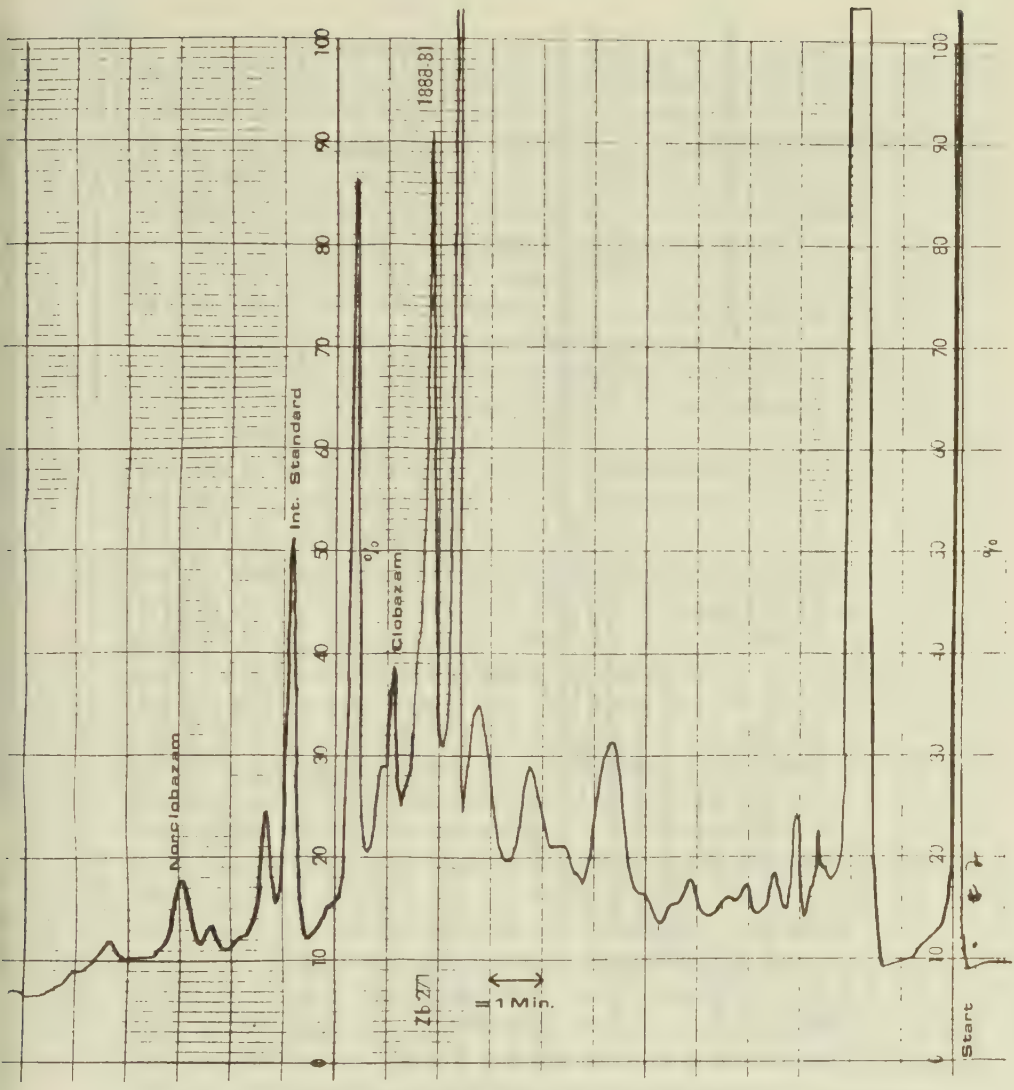


Abb.21: Hochdruckflüssigkeitschromatogramm mit den Peaks von Clobazam, Norclobazam und dem des internen Standard (Nor-Diazepam).
Die kurze Säule wurde dazu benutzt, Serumbestandteile "wegzusplitten". Die lange Säule wurde somit mit diesen Bestandteilen nicht belastet.
Durch die Wahl eines etwas polareren Fließmittels war es nicht erforderlich, Norclobazam vom langen Wege "wegzusplitten".

Abb.22: Hochdruckflüssigkeitschromatogramm aus Serumprobe Nr.3

Wie wir sehen, variieren die Werte in einigen Fällen erheblich. Im Falle des Clobazam unterscheidet sich der höchste Wert vom tiefsten ungefähr durch den Faktor 40. Dies mag zum einen auf der interindividuell verschiedenen Pharmakokinetik, die wiederum auf unterschiedlichen Resorptions-, Metabolisierungs- und Ausscheidungsleistungen gründet, basieren, zum anderen ist es aber möglich, daß die ärztlichen Verordnungen nicht immer eingehalten worden waren. Außerdem schwankte die Einnahmedauer von Frisium^{R}10 zum Zeitpunkt der Blutabnahme zwischen einigen Tagen und mehreren Monaten. Sehr hohe Werte scheinen in erster Linie bei solchen Patienten gefunden zu werden, die das Medikament schon längere Zeit genommen haben, wobei dann mit der Gewöhnung an das Arzneimittel sicher auch dessen Mißbrauchspotential wächst.

Soweit dies aus den hier vorliegenden Daten ersichtlich ist, gibt es keine feste Korrelation zwischen der Einnahmedauer von Clobazam und der Höhe des Norclobazam-Spiegels (siehe in diesem Zusammenhang Abschnitt 2.1. - Grundlagen der Pharmakokinetik -!). In Probe Nr. 6 beispielsweise beträgt der Norclobazam-Spiegel nur die Hälfte des Clobazam-Spiegels, obwohl das Medikament den Angaben gemäß schon ein Jahr lang genommen worden war. Erwartungsgemäß müßten die beiden Werte im steady state in etwa gleich hoch sein oder der Norclobazam-Gehalt müßte unter Umständen sogar den des Clobazams noch überschreiten (siehe die Abbildungen 25 und 14). Hier muß jedoch angefügt werden, daß dem Autor zu den Patienten keine weiteren Angaben über eventuell vorhandene somatische Krankheiten wie z.B. Leber- oder Nierenfunktionsstörungen gemacht worden waren, die ein abweichendes Verhalten im Verteilungsmuster von Clobazam und Norclobazam vielleicht erklären könnten.

Die wichtige Frage, ob zwischen der Höhe des Norclobazam-Spiegels und dem Auftreten von subjektiven Beschwerden wie Müdigkeit u.ä. eine enge Beziehung besteht, kann anhand der vorliegenden Daten und Angaben nicht beantwortet werden. Die in den Abbildungen 21 und 22 gezeigten

Chromatogramme, deren Laufzeit jeweils etwa 18 Min. betrug, weisen außer den Peaks von Clobazam, Norclobazam und dem des internen Standards (Nor-Diazepam) noch einige andere Peaks auf, die darauf schließen lassen, daß die betreffenden Probanden weitere Pharmaka genommen haben. Wir sehen daraus, daß die geschilderte Nachweismethode auch in diesen Fällen in der Lage ist, die einzelnen Pharmaka hinreichend gut zu trennen und auch, falls gewünscht, quantitativ nachzuweisen und somit für Routineuntersuchungen in der täglichen Praxis geeignet erscheint.

4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation ist, soweit dem Autor aus dem Schrifttum bekannt ist, die erste Arbeit, die sich mit der gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Bestimmung von Clobazam und Norclobazam mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie aus dem Plasma von Patienten befaßt.

Die Güte der Methode, d.h. ihr Vermögen, die genannten Stoffe in einem großen Konzentrationsbereich parallel in einem Arbeitsgang zu erfassen, wurde bereits eingehend geschildert. Eine Besonderheit an ihr ist die schon beschriebene Hintereinanderschaltung zweier Säulen, die es gestattet, Stoffe, die aufgrund sehr unterschiedlicher Polarität bei einer längeren (30 cm) Trennsäule sehr unterschiedlich lange Retentionszeiten aufweisen würden, in einem Arbeitsgang so zu erfassen, daß die Empfindlichkeit und Nachweisbarkeit für Substanzen mit sonst verhältnismäßig langer Verweildauer in der Säule verbessert wird.

Eine andere Möglichkeit, dieses Problem anzugehen, bietet die Gradient-Elution. Eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens findet sich bei Engelhardt[86]. Als Gradient-Elution bezeichnet man die programmierte Erhöhung der Elutionskraft des Eluenten (Trennflüssigkeit). Auch hierbei handelt es sich um den Versuch, das Trennsystem für Stoffe mit einem großen Polaritätsbereich zu optimieren. Das Prinzip der Methode ist, während ein und derselben Analyse das Fließmittel so zu ändern, daß in einem Arbeitsgang Stoffe unterschiedlichster Polarität (z.B. die unpolare Verbindung Squalan und der wasserlösliche und polare Stoff Glucose) getrennt und analysiert werden können. Bei diesem Verfahren treten allerdings zahlreiche Störfaktoren auf. Durch die ständige Änderung der Fließmittelzusammensetzung kommt es zu einem chemischen Ungleichgewicht, d.h. es entsteht kein Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase mehr.

Es kann zur Entmischung zwischen der lipophilen und lipophoben Phase kommen. Außerdem besteht die Schwierigkeit, am Anfang der nächsten Analyse wieder definierte Bedingungen zu haben, es ist also nicht leicht, das Trennsystem auf die Ausgangsbedingungen zurückzuführen.

Nachfolgend sollen einige Arbeiten, die sich ebenfalls mit dem Nachweis von Clobazam beschäftigen, besprochen werden.

In einer pharmakokinetischen Studie von Rupp und anderen[87)] wird Clobazam und Norclobazam u.a. nach Mehrfachdosierung mittels Gaschromatographie im Plasma bestimmt. Leider werden keine näheren Angaben zu dem Verfahren, insbesondere über eine eventuelle Derivatisierung der Substanz, wie sie sonst in der Gaschromatographie bei niedrigen Konzentrationen üblich ist, gemacht. In dieser Studie überstiegen übrigens nach der Einnahme von 2 x 10 mg Clobazam pro die über 28 Tage die Norclobazam-Konzentrationen schließlich die Werte für Clobazam um das achtfache. Allerdings handelte es sich hier wie auch bei den anderen geschilderten Versuchen im Gegensatz zu unserer Arbeit jeweils um junge gesunde Probanden.

Schütz[88)] beschreibt in seiner Arbeit u.a. kurz eine gaschromatographische Untersuchungsmethode für Clobazam und Norclobazam, die jedoch nur stichwortartig auf die gaschromatographischen Arbeitsbedingungen eingeht und ansonsten lediglich tabellarisch die Retentionszeiten und Retentionsindices für Clobazam, Norclobazam, Diazepam und Nitrazepam bei zwei verschiedenen Temperaturen und zwei verschiedenen Säulenpackungen festhält.

Stewart et al.[89)] zeigen eine quantitative fluorometrische Analysenmethode für Clobazam, die allerdings den Metaboliten Norclobazam nicht gleichzeitig nachweisen kann, da sich die entsprechenden Fluorophore in ihren Emissionsspektren sehr ähnlich sind. Sie ist also nur zum Nachweis des intakten Pharmakons geeignet.

In einer Arbeit von Vallner und Mitarbeitern[90)] zur Bioverfügbarkeit von Clobazam nach drei verschiedenen

oralen Darreichungsformen wird ebenfalls eine fluorometrische Methode zum quantitativen Nachweis von Clobazam angewendet. Auch hier kann Norclobazam nicht nachgewiesen werden.

Hunt[91] beschreibt eine Radioimmunoassay-Methode, die zwar für Clobazam spezifisch und auch sehr empfindlich ist, jedoch nicht zwischen der Mutterverbindung und den Metaboliten differenzieren kann.

In der bereits zitierten Arbeit von Sticht[59] wird Clobazam bei fünf Versuchspersonen nach therapeutischer Dosierung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie quantitativ nachgewiesen. Obwohl dessen Nachweisgrenze sehr tief liegt (20 ng/ml), wurde Norclobazam, welches ebenfalls im gezeigten Chromatogramm vermutet wird, nur qualitativ nachgewiesen. Außerdem wird in derselben Arbeit noch ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Bestimmung von Clobazam nach dessen Hydrolyse zu 5-Chlor-2-(N-methylacetamido)-diphenylamin, das mit einer Farbreaktion gekoppelt wird, beschrieben.

Wir sehen aus den oben erwähnten Arbeiten, daß mit einer Ausnahme jeweils nur Clobazam alleine qualitativ und quantitativ nachgewiesen wurde.

Zum Schluß seien noch einmal kurz die Vorzüge der Hochdruckflüssigkeitschromatographie gegenüber anderen Nachweisverfahren hervorgehoben:

1. das Verfahren ist relativ schnell,
2. die zu analysierenden Substanzen brauchen im Gegensatz zur Gas- und Dünnschichtchromatographie nicht derivatisiert (hydrolysiert) zu werden,
3. hohe Spezifität und Nachweisempfindlichkeit,
4. gutes Trennungsvermögen und gute Reproduzierbarkeit, (besonders bei der in dieser Arbeit angewandten Methode),
5. auch polare Stoffe können bestimmt werden - Erfassen eines großen Polaritätsbereiches durch die Säulenschaltung,
6. auch thermolabile Substanzen können untersucht werden.

5. Zusammenfassung und Schluß

Tranquillantien vom Benzodiazepin-Typ gehören seit einer Reihe von Jahren in vielen Ländern zu den am meisten verschriebenen Arzneimitteln.

Clobazam ist ein neues Pharmakon aus der Reihe der Benzodiazepine, das sich aber im Gegensatz zu den bisher in der Anwendung üblichen 1,4-Benzodiazepinen durch eine andere Stellung der Stickstoffatome im Benzodiazepin-Grundgerüst auszeichnet, nämlich eine 1,5-Position und gleichzeitig das erste 1,5-Benzodiazepinderivat, welches im Handel erschienen ist (Spezialität Frisium^{R}, Fa. Hoechst).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine relativ einfache Methode zum gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Nachweis von Clobazam und dessen Hauptmetaboliten, dem Demethylierungsprodukt Norclobazam, im Serum zu erarbeiten und nach Möglichkeit auch praktisch anzuwenden.

Auf die Bedeutung pharmakologisch aktiver Metaboliten, insbesondere auf die Möglichkeit ihrer Akkumulierung, wurde am Beispiel einiger anderer Benzodiazepine (Diazepam, Flurazepam) im Abschnitt "Grundlagen der Pharmakokinetik" hingewiesen.

Weiterhin wurde im theoretischen Teil ausführlich auf die verschiedenen klinischen Anwendungsbereiche der Benzodiazepine eingegangen. Man konnte daraus ersehen, daß diese Pharmaka in erster Linie im nicht-psychiatrischen Bereich eingesetzt werden. Der Anteil der Psychiatrie im engeren Sinne am gesamten Benzodiazepinverbrauch macht weit unter 10 % aus.

Unter den Nebenwirkungen ist die Sedierung (Müdigkeit) hervorzuheben, die sich beim Gebrauch dieser Stoffe als Schlafmittel auch noch am nächsten Tage als "hang over" bemerkbar machen kann.

Die akute Toxizität ist verglichen mit den Barbituraten äußerst gering.

Im experimentellen Teil der Arbeit wurde zunächst gezeigt, daß gaschromatographische Methoden nicht in der Lage waren, den Hauptmetaboliten Norclobazam nachzuweisen, jedenfalls nicht ohne Derivatisierung der Substanz.

Mit der schnellen Flüssigkeitschromatographie dagegen konnten beide Substanzen unverändert neben Diazepam und Nordiazepam qualitativ und quantitativ dargestellt werden.

Mit der beschriebenen Säulenschaltung konnte das System für Serumanalysen optimiert werden. Es wurde gezeigt, daß das Verfahren im Stande ist, die genannten Stoffe auch nach Extraktion aus der wässrigen Phase im therapeutischen Konzentrationsbereich zu bestimmen.

Schließlich wurde diese Nachweismethode an Serumproben von 17 Patienten aus der Praxis eines Kölner praktischen Arztes, die mit Clobazam behandelt wurden, angewandt. Die errechneten Serumkonzentrationen beliefen sich bei Clobazam auf Werte zwischen 40 und 1717 ng/ml und bei Norclobazam auf Werte, die zwischen 52 und 858 ng/ml lagen. Es wurde somit ein ziemlich großer Konzentrationsbereich erfaßt.

Die Frage, ob zwischen einem hohen Norclobazam-Serumspiegel und dem eventuellen Auftreten von Müdigkeit ein enger Zusammenhang besteht, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

Die beschriebene Nachweismethode zeichnete sich gegenüber anderen Bestimmungsverfahren für Clobazam dadurch aus, daß Clobazam und Norclobazam parallel in einem Arbeitsgang ohne jede Vorbehandlung (Derivatisierung) bestimmt werden konnten. Sie scheint aufgrund ihrer Einfachheit und Schnelligkeit sowohl für Forschungszwecke als auch für Routineuntersuchungen geeignet.

Literaturverzeichnis

1) GREENBLATT, D.J.; SHADER, R.I.:

Benzodiazepines in Clinical Practice.
New York: Raven Press 1974

2) BREIMER, D.D.:

Clinical Pharmacokinetics of Hypnotics.
Clinical Pharmacokinetics 2: 93 - 109, 1977

3) RIEDER, J.:

Plasma levels and derived pharmacokinetic characteristics of unchanged nitrazepam in man.
Arzneimittel-Forschung (Drug Research) 23: 212 - 218, 1973, zitiert in (2), S. 103

4) BREIMER, D.D. et al.:

Unpublished investigations, 1977, zitiert in (2), S. 103

5) MALPAS, A. et al.:

Persistent behavioural and electroencephalographic changes after single doses of nitrazepam and amylobarbitone sodium.
British Medical Journal 2: 762 - 764, 1970, zitiert in (2), S. 103

6) BOND, A.J.; LADER, M.H.:

Residual effects of Hypnotics.
Psychopharmacologia 25: 117 - 132, 1972, zitiert in (2), S. 103

7) BORLAND, R.G.; NICHOLSON, A.N.:

Comparison of the residual effects of two benzodiazepines (nitrazepam and flurazepam hydrochloride) and pentobarbitone sodium on human performance.
Brit. J. Clin. Pharmacol. 2: 9 - 17, 1975, zitiert in (2), S. 103

8) KAPLAN, S.A. et al.:

Blood level profile in man following chronic oral administration of flurazepam hydrochloride.
Journal of Pharmaceutical Sciences 62: 1932 - 1935, 1973, zitiert in (2), S. 104

9) RANDALL, L.O.; KAPPELL, B.:

Pharmacological activity of some benzodiazepines and their metabolites; in Garattini, Mussini and Randall (Eds.) The Benzodiazepines, p. 27 - 51 (Raven Press, New York 1973), zitiert in (2), S. 104

10) BIXLER, E.O. et al.:

The effects of hypnotic drugs on performance, Current Therapeutic Research 15: 13 - 24, 1973, zitiert in (2), S. 104

11) BOND, A.J.; LADER, M.H.:

Residual effects of flurazepam. British Journal of Clinical Pharmacology 2: 143 - 150, 1975, zitiert in (2), S. 104

12) RANDALL, L.O. et al.:

Pharmacology of the metabolites of chlordiazepoxide and diazepam. Current Therapeutic Research 7: 590 - 606, 1965

13) BENKERT, O.; HIPPIUS, H.:

Psychiatrische Pharmakotherapie. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1974, S. 191

14) SHULL, H.J. et al.:

Normal Disposition of Oxazepam in Acute Viral Hepatitis and Cirrhosis. Annals of Internal Medicine 84: 420 - 425, 1976

15) KLOTZ, U. et al.:

The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. J.Clin.Invest. 55: 347 - 359, 1975, zitiert in (14), S. 420

16) BORBÉLY, A.A. et al.:

Caffeine and chlordiazepoxide: effects on motor activity in the chronic thalamic rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290: 285 - 296, 1975

17) POLC, P.; HAEFELY, W.:

Effects of two benzodiazepines, phenobarbitone, and baclofen on synaptic transmission in the cat cuneate nucleus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294: 121 - 131, 1976

18) KELLER, H.H. et al.:

Interaction of benzodiazepines with neuroleptics at central dopamine neurons. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294: 1 - 7, 1976

19) MÜLLER, W.E.:

Über die Bedeutung der Plasmaproteinbindung für Verteilung und Wirkung von Tranquillantien vom Benzodiazepintyp.
Klin.Wschr. 55: 105 - 110, 1977

20) LADER, M.:

Anxiolytic drugs. The Practioner 215: 468 - 474, 1975

21) LAFFRANCHINI, S.:

Expérience de cinq années en pratique psychiatrique ambulatoire avec un tranquillisant nouveau, le Lexotanil (Ro 5-3350).
Therapeutische Umschau 32: 741 - 744, 1975

22) SCHMIDT, R.T. et al.:

Comparison of dantrolene sodium and diazepam in the treatment of spasticity.
Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry 39: 350 - 356, 1976; weitere Literaturhinweise finden sich bei (1)

23) MIKKELSEN, B. et al.:

Clonazepam in the treatment of epilepsy. A controlled clinical trial in simple absences, bilaterial massive epileptic myoclonus, and atonic seizures.
Arch.Neurol. 33: 322 - 325, 1976; weitere Literaturhinweise finden sich bei (1)

24) CACCIA, M.R.:

Clonazepam in facial neuralgia and cluster headache.
Clinical and electrophysiological study.
European Neurology 13: 560 - 563, 1975

25) MELSOM, M. et al.:

Diazepam in acute myocardial infarction. Clinical effects and effects on catecholamines, free fatty acids, and cortisol.
British Heart Journal 38: 804 - 810, 1976

26) BISKUP, L.:

Therapie des schweren Status asthmaticus beim Kind.
DMW 101: 1196 - 1198, 1976

27) ARTNER, J.:

Psychopharmaka in Gynäkologie und Geburtshilfe.
Wiener Medizinische Wochenschrift 125: 603 - 610, 1975

28) MEGENS, J.G.N.; ZWART, W.A.J.:

Valium intravenös während der Reposition von Frakturen und Luxationen.
Therapeutische Umschau 32: 764 - 768, 1975

29) siehe unter (13),
S. 187 und S. 201

30) BÜCH, H.P.; BÜCH, U.:

Hypnotika und Sedativa. Pharmakotherapie bei Schlafstörungen und Erregungszuständen.
Aus: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W. Forth, D. Henschler und W. Rummel.
Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/ Zürich B.I.-Wissenschaftsverlag 1975,
S. 390 - 397

31) siehe unter (13),
S. 223

32) KESSON, C.M. et al.:

Benzodiazepine drugs in general medical patients.
British Medical Journal 1, 680 - 682, 1976

33) KUSCHINSKY, G.:

Pharmakologie der Schlafmittel.
Internist 17, 239 - 244, 1976

34) CASTLEDEN, C.M. et al.:

Increased sensitivity to nitrazepam in old age.
British Medical Journal 1977, 1, 10 - 12

35) NIES, A. et al.:

Relationship between age and tricyclic antidepressant plasma levels.
Am.J.Psychiatry 134: 790 - 793, 1977

36) HESSE, C. et al.:

Geriatric Doses of Maprotiline, Serum Levels and Clinical Outcome in Depressive Patients between 61 and 78 Years of age.
Vortrag auf dem 8. Europäischen Kongreß für klinische Geriatrie, Neptun, 1977 (Rumänien)

37) BERRY, D.G.:

Effects of diazepam on the isolated chick embryo heart.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 150: 240 - 243, 1975

38) HAERTEN, K.; PÖTTGEN, W.:

Leukopenie nach Benzodiazepin-Derivaten.
Die Medizinische Welt 26: 1712 - 1714, 1975

39) SAFRA, M.J.; OAKLEY, G.P.:

Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam.
The Lancet 1975/II, 478 - 480

40) BENKE, A. et al.:

Der Einfluß von Flunitrazepam (Rohypnol^{R}) auf die Atmung.
Wiener klinische Wochenschrift 87: 656 - 658, 1975

41) siehe unter (13),

S. 177

42) GRIECO, C. et al.:

Structure-Activity Correlations For Antibacterial 1,5-Benzodiazepine Derivatives On Gram-Positive Cells.
Il Farmaco 32 (12): 909 - 922, 1977

43) KUCH, H.:

Clobazam: chemical aspects of the 1,4 and 1,5-benzodiazepines.
Br.J.clin.Pharmac. (1979), 7 Suppl 1: 17S - 21S

44) BARZAGHI, F. et al.:

Pharmacological and toxicological properties of Clobazam, a new psychotherapeutic agent.
Arzneim.-Forsch. 23, Nr. 5, 683 - 868, 1973

45) RADMAYR, E.; KOEPPEN, D.:

Clobazam (Frisium^{R}) in der täglichen Praxis. Offene Halbjahresstudie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit.
Münch.med.Wschr. 119 (1977), Nr. 50, 1623 - 1626

46) MOREAU, Ph.:

Etude clinique d'un nouvel anxiolytique, le clobazam.
Gaz.méd.France 83: 481 - 485, 1976

47) HUNT, B.J. et al.:

Preliminary studies in humans on clobazam (HR 376) - a new antianxiety agent.
Brit.J.Clin.Pharmacol. 1: 174 - 175, 1974

48) SANDLER, K. et al.:

A preliminary evaluation of the anxiolytic activity of Clobazam.
Current Therapeutic Research 21: 114 - 116, 1977

49) Del SOLDATO, G.; PUCCETTI, F.:

Valutazione clinica di una nuova benzodiazepina di sintesi: "LM 2717" o Clorepina.
Rass.Studi Psichiat. 60: 697 - 718, 1971

50) CHAPPA, H.; MOIZESZOWICZ, J.:

Utilidad de la diferenciación de benzodiacepinas en el tratamiento de la ansiedad.
Pren.méd.argent. 63: 339 - 342, 1976

51) DEVANTHAN, S.; CHANNABASAVANNA, S.M.:

A controlled clinical study with Clobazam - a new anxiolytic agent.
Current Therapeutic Research 21: 361 - 367, 1977

52) LAUDANO, O. et al.:

Effect of a new benzodiazepine derivate, clobazam, in anxious patients with gastrointestinal disorders.
J.Clin.Pharmacol. 17: 441 - 446, 1977

53) BORLAND, R.G.; NICHOLSON, A.N.:

Immediate effects on human performance of a 1,5-benzodiazepine (Clobazam) compared with the 1,4-benzodiazepines, chlordiazepoxide hydrochloride and diazepam.
Brit.J.Clin.Pharmacol. 2: 215 - 221, 1974

54) BERRY, P.A. et al.:

An evaluation of the effects of clobazam on human motor coordination, mental acuity and mood.
Brit.J.Clin.Pharm. 1: 346, 1974

55) RIGAL, J.; SAVELLI, A.:

Clobazam, fonctions de vigilance et conduite automobile.
Gaz.méd.France 82: 3908 - 3914, 1975

56) HINDMARCH, I. et al.:

Clobazam, a 1,5-benzodiazepine and car-driving ability.
Brit.J.clin.Pharmac. 4: 573 - 578, 1977

57) CAILLE, E.-J.; BASSANO, J.-L.:

Etude de l'influence d'une benzodiazepine sur le sommeil, la thymie et le comportement.
Psychologie Médicale 7 Nr. 1: 383 - 391, 1975

58) LEYGONIE, F. et al.:

Anxiolytique nouveau, le RU 4723. Action sur le sommeil de nuit et le niveau de performance au réveil.
Gaz.méd.France 82: 1303 - 1310, 1975

59) STICHT, G.; KÄFERSTEIN, H.:

Nachweis von Clobazam (Frisium^{R}) in biologischem Material.
Z.Rechtsmed.82, 105 - 112 (1978)

60) CLARKE, C.H. et al.:

Effect of the 1,5-benzodiazepines, clobazam and triflubazam, on the sleep of man.
Brit.J.Pharmacol. 58: 439, 1976

61) RUPP, W. et al.:

Kinetic interaction of nomifensine with a 1,5-benzodiazepine (Clobazam).
Br.J.clin.Pharmac. 4: 143 - 146, 1977

62) BERRY, D.J.:

The cathode-ray polarographic determination of diazepam, 7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2 H-1,4-benzodiazepine-2-one, in human plasma.
Clin.Chim.Acta. 32 (1971), 235 - 241

63) KOECHLIN, B.A.; D'ARCONTE, L.:

Analyt.Biochem., 1963, 5, 195, zitiert in (81), S. 256.

64) De SILVA, J.A.F. et al.:

Blood level distribution patterns of diazepam and its major metabolite in man.
J.Pharm.Sci. 55, No. 7, S. 692 - 702, 1966

65) BAILY, L.C.; SHROFF, A.P.:

Simultaneous analysis of a 1,5-benzodiazepine and its metabolite in blood and urine by spectrodensitometry.
Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. Vol. 7, No. 1, 1974, S. 105 - 118

66) FRINGS, C.S.; COHEN, P.S.:

Rapid colorimetric method for the quantitative determination of librium (chlordiazepoxide hydrochloride) in serum.
Am.J.Clin.Path. 56, 216 - 219, 1971, zitiert in (65), S. 106

67) BAILEY, L.C.; SHROFF, A.P.:

GLC determination of 7-trifluoromethyl-1-methyl-5-phenyl-1 H-1,5-benzodiazepine-2,4-(3 H,5 H)-dione in plasma.
Journal of Pharmaceutical Sciences 62, S. 1274 - 1277, 1973

68) GREAVES, M.S.:

Quantitative determination of medazepam, diazepam, and nitrazepam in whole blood by flame-ionization gas-liquid chromatography.
Clinical Chemistry 20/2, 141 - 147 (1974)

69) HEIDBRINK, V. et al.:

Zur gaschromatographischen Analytik der Benzodiazepine.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, Nr. 4 (1975), S. 516 - 517

70) WHELPTON, R.; CURRY, S.H.:

Gas-chromatographic separation of chlorpromazine, diazepam and N-desmethyldiazepam,
J.Pharm.Pharmac., 1975, 27, 970

71) GAMBLE, J.A.S. et al.:

Estimation of plasma diazepam.
Anaesthesia, 1975, Vol. 30, pages 159 - 163

72) STEYN, J.M.; HUNDT, H.K.L.:

Quantitative gas chromatic determination of diazepam and its major metabolite in human serum.
Journal of Chromatography, 107 (1975), 196 - 200

73) KANGAS, L.:

Comparison of two gas-liquid chromatographic methods for the determination of nitrazepam in plasma.
Journal of Chromatography, 136 (1977), 259 - 270

74) SCOTT, C.G.; BOMMER, P.:

The liquid chromatography of some benzodiazepines.
Journal of Chromatographic Science, Vol. 8 (1970), S. 446 - 448

75) CHAN, M.L. et al.:

Use of high pressure liquid chromatography for the separation of drugs of abuse.
Journal of Chromatographic Science, Vol. 12 (1974), S. 512 - 516

76) MACEK, K.; REHAK, V.:

High-resolution liquid chromatography of some psychotropic drugs.
Journal of Chromatography, 105 (1975), 182 - 185

77) HUETTEMANN, R.E.; SHROFF, A.P.:

High-pressure liquid chromatographic analysis of triflubazam and its metabolites in human and animal blood and urine.
Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 64, No. 8, 1975, S. 1339 - 1342

78) HARZER, K.; BARCHET, R.:

Analyse von Benzodiazepinen und deren Hydrolysenprodukte, den Benzophenonen, durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in umgekehrter Phase und ihre Anwendung auf biologisches Material.
Journal of Chromatography 132 (1977) 83 - 90

79) PESKAR, B.; SPECTOR, S.:

J.Pharmacol.Exp.Ther. 186 (1973), 167, zitiert in (80), S. 563

80) HAILEY, D.M.:

Chromatography of the 1,4-benzodiazepines.
Journal of Chromatography 98 (1974), 527 - 568

81) CLIFFORD, J.M.; SMYTH, W.F.:

The determination of some 1,4-benzodiazepines and their metabolites in body fluids - A review.
Analyst, Vol. 99, No. 1178 (1974), 241 - 272

82) NELSON, J.A.:

Some clinical and pharmacological applications of high-speed liquid chromatography.
Adv.Chromatogr. 15 (1977), 273 - 305

83) HESSE, Chr.; HÖVERMANN, W.:

Ein Dreikomponenten-Zweiphasensystem für die schnelle Flüssigkeits-Chromatographie.
Chromatographia, Vol. 6, No. 8/9, 1973, S. 345 - 348

84) HESSE, Chr. et al.:

Identifizierung und quantitative Bestimmung von Diäthylstilböstrol und Dienöstrol mit der schnellen Flüssigkeits-Chromatographie.
Chromatographia, Vol. 10, No. 5, 256

85) ENGELHARDT, H.:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.
Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York
1975

86) siehe unter (85),
S. 121 ff.

87) RUPP, W. et al.:

Pharmacocinetics of single and multiple doses
of clobazam in humans.
Br.J.clin.Pharmac. (1979), 7, 51S - 57S

88) SCHÜTZ, H.:

Analytische Daten des neuen 1,5-Benzodiazepins
Clobazam (Frisium^{R}) und seines Hauptmetaboli-
ten Nor-Clobazam.
Arch.Toxicol. 41, 233 - 238 (1978)

89) STEWART, J.T. et al.:

Fluorometric determination of clobazam, a 1,5-
benzodiazepine, in human plasma.
Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 68,
No. 4 (1979), S. 494 - 496

90) VALLNER, J.J. et al.:

Plasma levels of clobazam after three oral
dosage forms in healthy subjects.
The Journal of Clinical Pharmacology, 18
(7), 1978, 319 - 324

91) HUNT, P.:

Assay of clobazam in human serum by a
radioreceptor technique.
Br.J.clin.Pharmac. (1979), 7, 37S - 40S

Lebenslauf

Ich wurde am 15.2.1951 als viertes Kind des späteren Vorstandsmitgliedes der Rheinische Braunkohlenwerke AG Köln Dr. jur. Konrad Adenauer und seiner Ehefrau Carola Adenauer, geb. Hunold, in Köln geboren.
Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.
Ostern 1957 wurde ich in die Kath. Volksschule Freiligrathstraße in Köln-Lindenthal eingeschult.
Nach bestandener Aufnahmeprüfung wechselte ich Ostern 1961 auf das Staatl. Apostelgymnasium in Köln-Lindenthal über, wo ich am 15.6.1970 das Abitur bestand.
Nach der Reifeprüfung beschloß ich, Humanmedizin zu studieren. Wegen des Numerus clausus in diesem Fach war ich zunächst während des Studienjahres 1970/71 an der Medizinischen Fakultät der Universität Löwen in Belgien immatrikuliert. 1971 kehrte ich nach Köln zurück und schrieb mich an der hiesigen Universität in das Fach Mineralogie der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät ein. Ich belegte medizinische Vorlesungen und absolvierte als Nichtmediziner die Kurse in Physik und Chemie für Mediziner, um dann nach Anrechnung von zwei Semestern des naturwissenschaftlichen Studiums auf die naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum) durch den Gesundheitsminister in Düsseldorf am 16.3.1973 in Köln als Externer das Vorphysikum abzulegen. Aufgrund dieser Prüfung wurde ich zum WS 1973/74 in die Medizinische Fakultät der Universität Köln übernommen.
Am 9.10.1975 bestand ich in Köln die ärztliche Vorprüfung (nach Bestallungsordnung). Das klinische Studium absolvierte ich nach der neuen Approbationsordnung. Am 10.4. und 24.4.1980 habe ich den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich in Köln abgelegt und damit die Ärztliche Prüfung am 24.4.1980 bestanden.
Am 21.5.1980 erhielt ich die Approbation als Arzt.
Zur Zeit arbeite ich in einer Kölner Klinik auf der Inneren Abteilung als Assistenzarzt.

Die vorliegende Arbeit fertigte ich in den Jahren 1976 bis 1980 während meines Studiums an der Rheinischen Landesklinik in Köln-Merheim (Direktor: Prof. Dr. med. M. Bergener) an. Herrn Dr. rer.nat. C. Hesse möchte ich für die stete Betreuung dieser Dissertation ganz besonders danken.

Köln, den 30. September 1980

Karl Schmauß

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Köln, den 30. September 1980

Karl Schramm

Druck: Hundt Druck GmbH, Zülpicher Str. 220, 5000 Köln 41, Tel. (0221) 444152